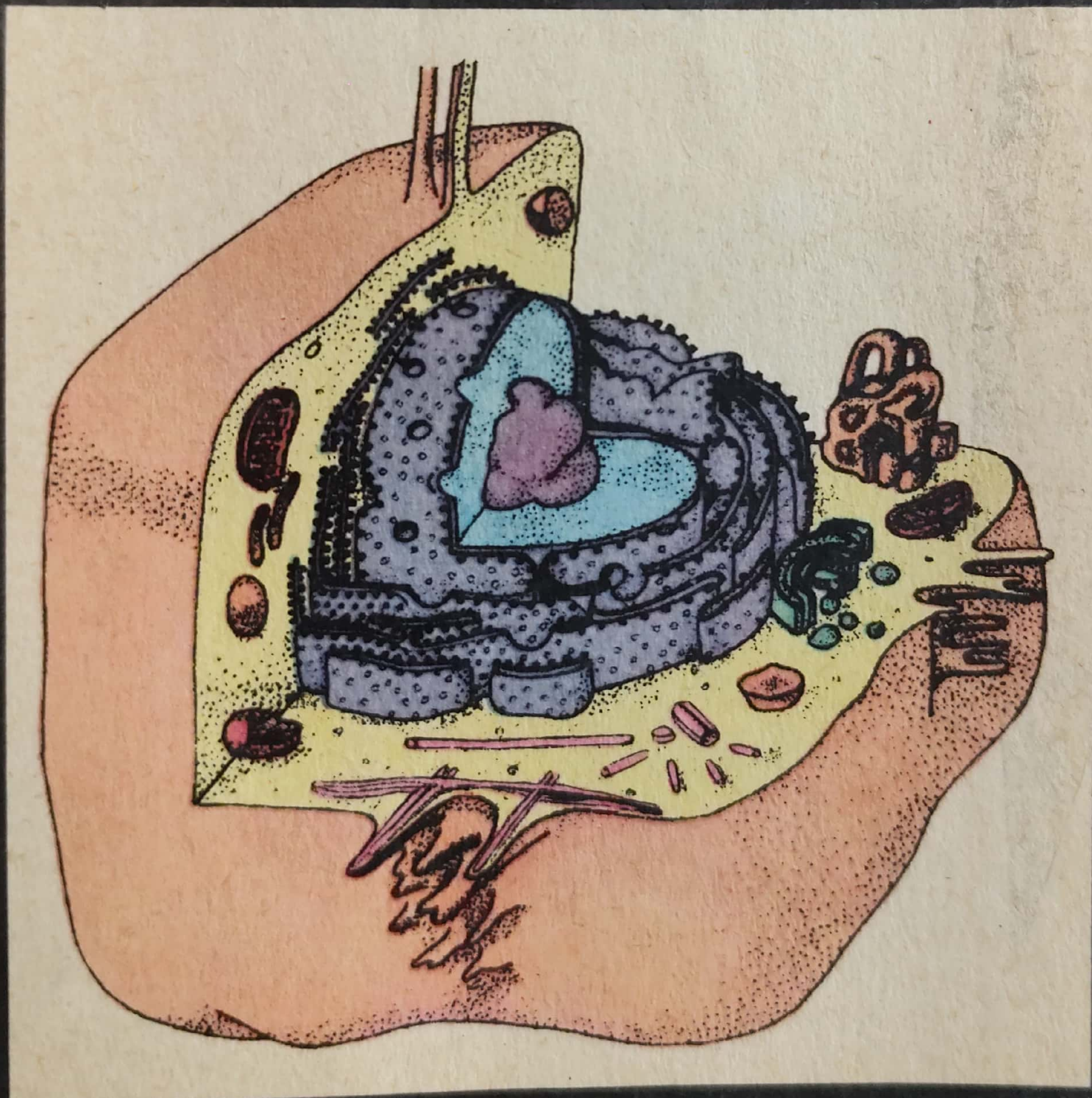
CONSTANTIN COTRUTZ
CARMEN COTRUTZ · MARIA KOCSIS
CEZAR RADU IONESCU

MANUAL DE LUCRĂRI PRACTICE DE BIOLOGIE CELULARĂ



EDITURA "TEHNICA"
1994

Scanned with OKEN Scanner

AN III BIOINGINERIE
AN I MEDICINĂ GENERALĂ

Prof. Univ. Dr CONSTANTIN COTRUTZ

Dr. CARMEN COTRUTZ **Chim. MARIA KOCSIS** **Fiz. C.R.IONESCU**

Departamentul de Biologie Celulară şi moleculară
Universitatea de Medicină şi Farmacie Gr.T.Popa - Iaşi

MANUAL
de
LUCRĂRI PRACTICE DE BIOLOGIE CELULARĂ

Editura•TEHNICA•
CHIŞINĂU
1994


Scanned with OKEN Scanner

REFERENT ŞTIINŢIFIC
prof.univ.dr.D.D.BRĂNIŞTEANU
Departamentul de fiziologie
U.M.F."Gr.T.Popa" - Iaşi

Format 70 x 100 •1/16
Tiraj 10000 ex.
Coli de tipar : 15,5
Editura "TEHNICA"
Chişinău, str. Studenţimii, 9
Comanda nr. 422
Firma editorial - poligrafică "Tipografia centrală"
277068, Chişinău, Florilor, 1.

Manual de lucrări practice de biologie celulară.
În 1 volum/C-tin Cotrutz, C.Cotrutz, M. Kocsis, C.R.Ionescu - ed.Tehnica 1994 - 244 p.

ISBN 5-85268-314-0

Lucrarea de faţă, ediţie revizuită şi îmbunătăţită a îndrumătorului de lucrări practice de biologie celulară litografiat în 1989, se adresează studenţilor de la facultăţile de Medicină, Stomatologie şi de la alte facultăţi cu profil biologic, în dorinţa de a-i iniţia în metodologia complexă de studiu a celulei.

c C-tin Cotrutz, 1994

MOTTO

"Mintea e ciutura care stă deasupra fântânii vieţii şi coboară numai pentru a se umple cu răcoarea îmvăţăturii."

(Vasile Voiculescu - *Aşchii de meditaţie*)

Scanned with OKEN Scanner

"Vom trăi o perioadă extraordinară în materie de dezvoltare a științelor biologice. Pe măsură ce vom aplica tehnici de biologie celulară și moleculară în cercetarea medicală, mare parte a enigmelor patologiei umane vor fi rezolvate în următorii ani. Sunt convins că științele medicale vor cunoaște de acum înainte faza cea mai productivă și cea mai pasionantă din istoria lor. Ferice tinerilor practicieni care vor fi actorii."

Sir David Weatherall - *The New Genetics and Clinical Practice* - Oxford University Press - 1985

INTRODUCERE

Disciplină relativ nouă și în continuu progres, rezultatul unei îndelungate evoluții înregistrate în studiul celulei atât sub aspect morfologic, funcțional și molecular, biologia celulară și moleculară urmărește să formeze studenților în medicină și biologie conceptele generale asupra biologiei celulare normale dar și patologice cât și de a-i introduce în diversitatea structuralizării corpurilor vii.

Dezvoltarea biologiei celulare și moleculare contemporane se realizează în două direcții care au condus și la nașterea acestei ramuri a științelor biologice: perfecționarea tehnicilor de investigare a celulei pe de o parte, și progresele conceptuale pe de altă parte.

Dintre principalele tehnici de investigare a celulei le amintim pe cele folosite cu succes în ultimii ani: microscopia fotonică revitalizată, microscopia electronică cu perfecționări ale tuturor variantelor sale, fracționarea celulară prin ultracentrifugare diferențiată, tehnici biofizice, biochimice, ca și o serie de tehnici de biologie celulară și moleculară dezvoltate în special în ultimii ani, au condus la elaborarea de tehnologii complexe bazate pe culturi de celule, fuziuni celulare, etc.

Această succintă trecere în revistă a principalelor metode de investigare a celulelor și progreselor acestora, departe de a fi completă, ilustrează totuși dinamismul acestei ramuri a biologiei contemporane iar integrarea informațiilor primite prin toate metodele și la toate nivelele constituie o altă caracteristică a dezvoltării disciplinei de biologie celulară și moleculară contemporane.

Lucrarea de față, ediție revizuită și îmbunătățită a îndrumătorului de lucrări practice de biologie celulară litografiat în 1989, se adresează studenților de la facultățile de Medicină, Stomatologie și de la alte facultăți cu profil biologic, în

Scanned with OKEN Scanner

dorinţa de a-i iniţia în metodologia complexă de studiu a celulei.

Materialul prezentului manual de lucrări practice este structurat în două părţi: partea I-a -consacrată principalelor tehnici utilizate în biologia celulară, trecând în revistă doar o parte a acestora, cele aflate la îndemâna departamentului nostru şi partea a II-a - conţinând studiul general al celulei, menită a evidenţia mai clar atât tehnologia cât şi obiectul biologiei celulare.

Dezvoltarea viitoare a biologiei celulare şi moleculare este nelimitată şi putem afirma cu toată convingerea că azi cunoaştem doar vârful unui iceberg a cărui parte pe care nu o vedem este infinită şi din care vom explora cu siguranţă din ce în ce mai mult, în scopul îmbunătăţirii stării de sănătate, a vieţii omului, a condiţiei umane pe Terra.

Mulţumim D-nei ing. Minodora Bălţătescu de la disciplina noastră care, prin munca şi talentul său, a reuşit să execute grafica acestui manual şi tuturor acelor cititori care comunicându-ne sugestiile lor vor contribui la o mai mare claritate şi dezvoltare a unor capitole din acestă primă ediţie.

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner


I. *MIJLOACE TEHNICE DE STUDIU ÎN BILOGIA CELULARĂ*

Studiul celulei a progresat în ultima perioadă şi datorită perfecţionării metodelor de investigare, permiţând acumularea de noi observaţii. Astfel, microscopia electronică de transmisie cu voltaj înalt a îngăduit observarea pentru prima dată a celuleor vii. Utilizarea difracţiei cu raze X a produs o revoluţie în ştiinţele biologice prin descifrarea structurii spaţiale a proteinelor şi acizilor nucleici; combinată cu microscopia electronică a permis obţinerea structurii tridimensionale a unor ansambluri ca de exemplu bacteriorodopsina. Metoda difracţie-dispersie a permis descifrarea organizării moleculare a cromatinei. Rezonanţa magnetică magnetică nucleară de înaltă rezoluţie a fost utilizată în elucidarea interacţiunilor moleculare în membranele bilogice şi în studii metabolice pe celule intacte. Tehnicile de spectrofluorometrie s-au perfecţionat în ultimul timp permiţând aprecierea prin probe de fluorescenţă a vâscozităţii membranelor, a difuziei sau rotaţiei proteinelor membranare iar tehnicile biochimice de bilogie moleculară au ajuns de neînlocuit, atât ca o completare a metodelor amintite cât şi în mod independent. În ultimii ani s-au elaborat tehnologii de biologie celulară şi moleculară complexe bazate pe culturi celulare, fuziuni celulare, purificări de gene (tehnologia ADN-ului recombinat), etc.

Putem afirma deci că biologia celulară şi moleculară foloseşte metode de studii morfologice, biochimice, funcţionale, biofizice, etc. În vederea înţelegerii organizării ansamblurilor de molecule în structuri, a proceselor legate de biosinteza acestora precum şi funcţiile asociate lor, a proceselor patologice, deci pentru investigarea în domeniul ultrastructural, este necesară coborârea treptată, cu ajutorul mijloacelor moderne de investigare de la celulă la atom, aşa cum este prezentată în fig.1.

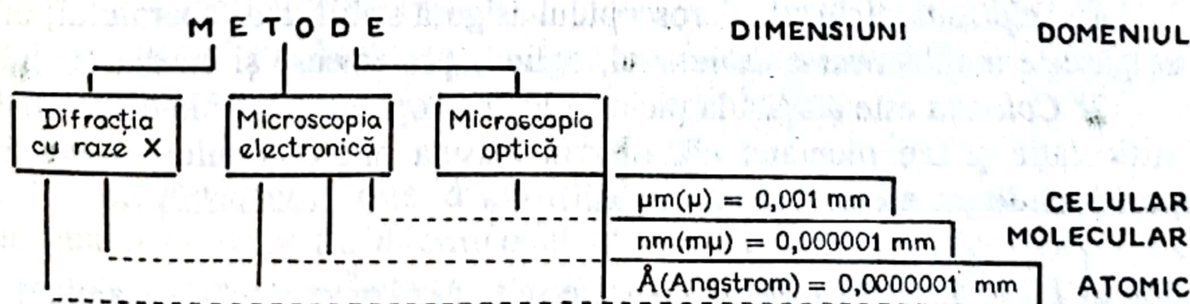


Fig.1.

Dintre mijloacele tehnice morfologice, o primă etapă în studiul celulei este reprezentată de microscopia fotonică.

1.1. MICROSCOPUL FOTONIC

Microscopul fotonic este un aparat optic de mărit care utilizează ca sursă de radiaţie fotonul, element din spectrul undelor electromagnetice.

Examenul citologic în microscopia fotonică este limitat de puterea de separare sau rezoluţie a aparatului, calitatea cea mai de preţ a unui microscop. Puterea de rezoluţie reprezintă cea mai mică distanţă la care două puncte pot fi văzute distinct şi se calculează după formula lui Abbe. Se consideră ca limită maximă pentru puterea de rezoluţie a microscopului fotonic este de 0,2 microni, valoare care nu va putea fi depăşită din cauza lungimii de undă mari a fotonului.

Prin montarea unor dispozitive speciale la microscopul fotonic obişnuit, se poate realiza:

- microscopia în contrast de fază,
- microscopia în lumină fluorescentă,
- microscopia pe fond întunecat,
- microscopia în lumina polarizată.

1.1.1. *Microscopul fotonic obişnuit*

Microscopul fotonic obişnuit se compune din trei părţi: mecanică, optică şi sursa de lumină.

1.1.1.1. **Partea mecanică sau stativul** microscopului este construit din metal şi reprezintă suportul pentru partea optică şi sursa de lumină. Se compune din:

1. *Talpa sau piciorul* microscopului asigură stabilitatea aparatului; în ea se găseşte montată sursa de lumină, oglinda proiectoare şi un diafragm.

2. *Coloana* este ataşată la piciorul microscopului printr-un dispozitiv de articulaţie şi are montate: platina sau măsuţa microscopului, tubul şi dispozitivul de punere la puct a imaginii.

a. <u>*Platina*</u> este dispozitivul pe care se fixează preparatul de examinat. Are o formă rotundă sau pătrată şi este dispusă perpendicular pe axa optică a microscopului; în centru are o deschidere rotundă sau dreptunghiulară prin care trec razele de lumină spre preparatul de examinat. Cu ajutorul a două

vize laterale, platina se poate deplasa în plan orizontal în vederea examinării preparatului pe toată suprafaţa sa. Pe faţa ei superioară se găsesc două dispozitive de fixare a portobiectului (valeţi) şi o riglă gradată destinată reperării unor teritorii de pe suprafaţa preparatului (fig.2).

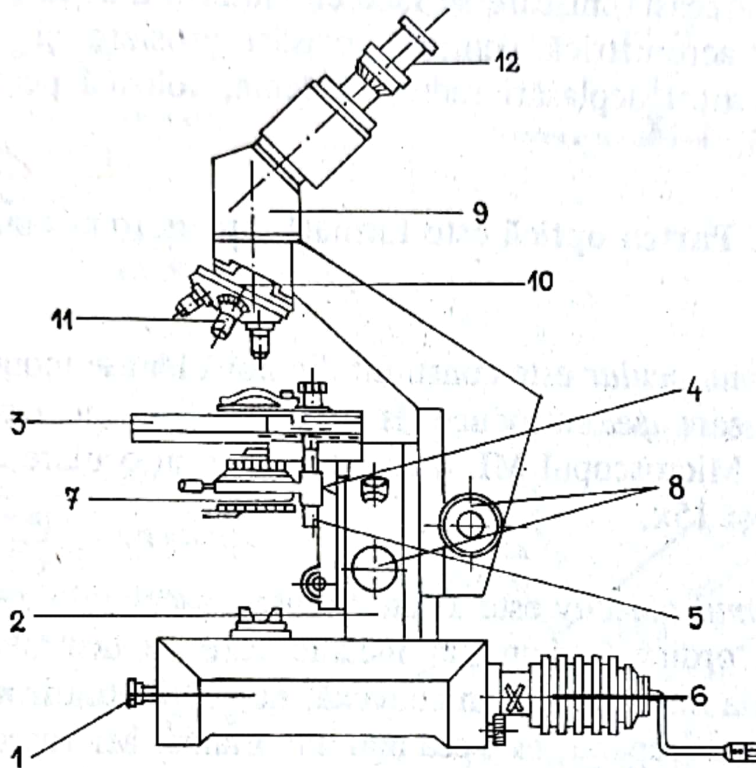


Fig.2. 1-Talpa microscopului; 2-Coloana; 3-Platina; 4-Dispozitivul de mişcare a platinei; 5-idem; 6-Sursa de lumină; 7-Condensatorul; 8-Macro şi microviza; 9-Tubul microscopului; 10-Revolverul; 11-Obiective; 12-Ocularul

b. *Tubul* are montat la extremităţi sistemul obiectiv-ocular (în partea inferioară sistemul obiectiv iar în partea superioară sistemul ocular). Cu ajutorul a două şuruburi numite vize, tubul se deplasează în sus sau în jos, mişcări necesare pentru obţinerea unei imagini clare.

c. *Revolverul* este dispozitivul pe care se montează elementele sistemului obiectiv (la microscopul ML4 sunt montate cinci obiective de puteri măritoare crescânde care pot fi aduse în axa optică a microscopului). Este format din două discuri: unul mobil pe care se fixează cele cinci obiective cu puteri măritoare crescânde şi altul fix care se ataşează la extremitatea inferioară a tubului; acesta din urmă este prevăzut cu un

dispozitiv de stopare care blochează fiecare obiectiv în parte când axa acestuia coincide cu axa optica a microscopului.

d. Dispozitivul de punere la punct este necesar pentru obţinerea de imagini clare şi se realizează prin deplasarea sistemului obiectiv - ocular în sus sau în jos. Această mişcare se face cu ajutorul a doua şuruburi numite vize: - viza macrometrică pentru deplasări grosiere şi rapide şi viza micrometrică pentru deplasări reduse şi lente, folosită pentru punerea la punct a imaginii.

1.1.1.2. **Partea optică** este formată din sistemul ocular şi sistemul obiectiv.

1. *Sistemul ocular* este constituit din două lentile montate într-un tub metalic scurt care se introduce la extremitatea superioară a tubului microscopului. Microscopul ML 4 este prevăzut cu oculare care măresc de 5x., 7x., 10x. şi 15x.

2. *Sistemul obiectiv* este alcătuit dintr-o asociaţie de lentile montate într-o anumită ordine într-un tub metalic care se înşurubează pe capul revolver. Lentila inferioară, plan convexă, numită lentila frontală, orientată cu faţa plană spre preparat, este cea mai importantă. Microscopul ML 4 este dotat cu obiective uscate cu puterea de mărire de 6x., 10x., 20x., 40x. şi cu imersie (ulei + de cedru) care are o putere de mărire de 90x (fig.3).

1.1.1.3. **Sursa de fotoni şi dispozitivul de transmisie** cuprinde:

1. *Sursa de lumină* este inclusă în talpa microscopului şi este reprezentată de un bec de 6V alimentat de un transformator.

2. *Dispozitivul de transmisie* este reprezentat de o oglindă plană montată în tapla microscopului şi are rolul de a orienta razele luminoase în axul optic al microscopului cu ajutorul a două vize. Între sursa de lumină şi oglindă se găseşte un diafragm iris.

3. *Condensorul de lumină* este un sistem de lentile montate într-un dispozitiv mobil aflat sub platină şi are rolul de a focaliza lumina pe preparatul microcopic. Pentru o iluminare eficientă a preparatului este necesară corectarea aperturii numerice a condensorului cu cea a obiectivului

şi se realizează cu ajutorul unui diafragm iris, manipulat cu o pârghie.

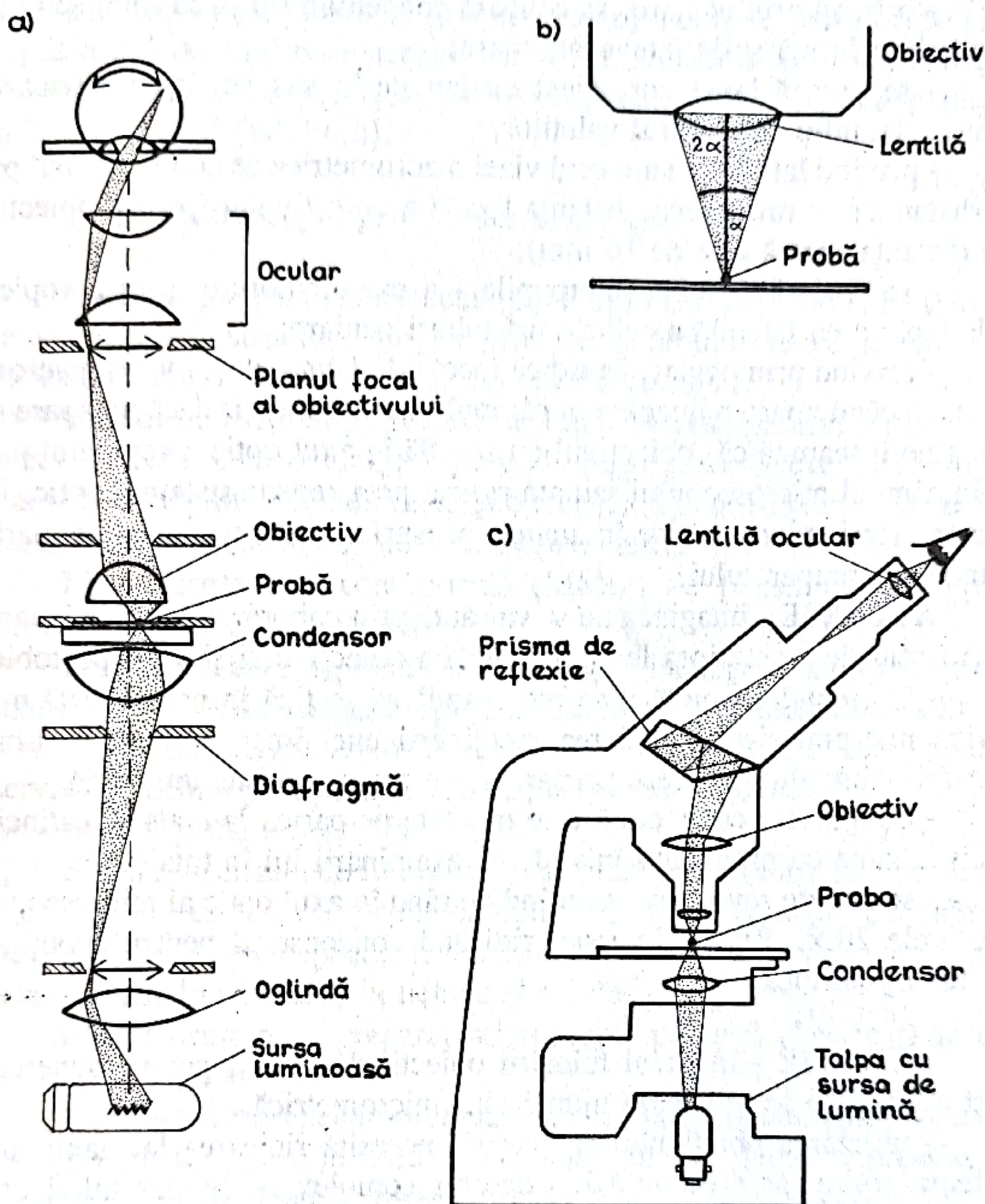


Fig.3. Sursa de lumină, partea optică şi formarea imaginii la microscopul fotonic

1.1.1.4. Tehnica de lucru

- Se stabileşte legătura între becul microscopului şi transformator care se conectează apoi la reţeaua de 220 V;
- prin rotirea revolverului se aduce în axul optic al microscopului

obiectivul 10.x;

- privind prin oculare, se coboară condensatorul până când se obţine o lumină uniformă şi de intensitate mare;

- se aşează lama portobiect cu lamela în sus pe faţa superioară a platinei, fixând-o cu ajutorul valeţilor;

- privind lateral, cu ajutorul vizei macrometrice se coboară tubul până la o distanţă mai mică decât distanţa focală a obiectivului (pentru obiectivul 10.x distanţa focală este de 16 mm);

- se fixează distanţa interpupilară a examinatorului prin apropierea sau îndepărtarea laterală a celor două tuburi oculare;

- privind prin ocular, se ridică încet tubul cu ajutorul vizei macrometrice până când apare o imagine în câmpul microscopului; dacă nu apare nici o imagine înseamnă că: obiectivul nu se află în axul optic, preparatul nu se află în câmpul microscopului sau am ridicat prea repede sistemul optic. Prin mişcarea vizei micrometrice în ambele sensuri se obţine o imagine clară şi luminoasă a preparatului.

ATENŢIE - imaginea nu se va căuta prin coborârea tubului deoarece există riscul de a deteriora lentila frontală a obiectivului şi lama portobiect;

- în timpul examinării se recomandă să se ţină în permanenţă mâna pe viza micrometrică în vederea menţinerii unei imagini clare în timpul deplasării câmpului deoarece preparatul nu are o grosime uniformă;

- cu ajutorul celor două vize montate pe partea laterală a platinei se va mişca lama cu preparatul în vederea examinării lui în totalitate;

- se roteşte revolverul aducând pe rând în axul optic al microscopului obiectivele 20.x, 40.x şi imersie, ridicând condensorul pentru a obţine o iluminare puternică.

ATENŢIE - în cazul folosirii obiectivelor mari, pentru punerea la punct a imaginii se utilizează numai viza micrometrică.

- utilizarea obictivului cu imersie necesită ridicarea la maximum a condensatorului iar difragmul iris deschis complet; pe preparatul fixat pe lama (frotiu de sânge colorat) se pune o picătură de ulei de cedru. Cu tubul ridicat se roteşte capul revolver şi se aduce în axul optic obiectivul de imersie; privind lateral, se coboară tubul cu ajutorul vizei macrometrice până când lentila frontală a obiectivului a făcut contact cu picătura de ulei de cedru şi se află în imediata vecinătate a lamei portobiect (aproximativ 2 mm). Privind prin ocular, se prinde imaginea coborând sau ridicând încet tubul microscopului cu ajutorul vizei macrometrice iar punerea la punct a imaginii se obţine cu viza micrometrică;

- după examinare, se ridică tubul microscopului cu 1-2 cm., se dă jos lama portobiect de pe platină şi se îndepărtează uleiul de cedru de pe lentila frontală a obiectivului prin ştergere cu vată înmuiată în xilol sau benzen;

- după folosire, microscopul se deconectează de la reţea şi se pune la adăpost de praf (sub husă).

1.1.2. *Microscopia prin fluorescenţă*

Microscopia prin fluorescenţă pune în evidenţă fenomene luminoase care iau naştere în structuri bilogice primare (naturale) sau a celor secundare provocate cu ajutorul substanţelor numite fluorocromi.

Metoda se bazează pe proprietatea unor substanţe care, iradiate cu un fascicol de lumină cu o lungime de undă mică şi cu frecvenţă înaltă emit radiaţii cu o lungime de undă mare şi o frecvenţă mai joasă deci, de culoare diferită. Aceste substanţe se numesc **fluorescente**.

Fluorescenţa este condiţionată (Mayer) de prezenţa unor grupări fluorofore cum ar fi: azin, oxazin, etc.

În practica curentă, prin fluorescenţă se înţelege emiterea de radiaţii luminoase de către o substanţă supusă acţiunii razelor ultraviolete (300 - 400 milimicroni). Se formează o imagine vizibilă, colorată, care poate fi observată cu ochiul protejat de un filtru pentru radiaţiile ultraviolete sau care impresionează placa fotografică (fig.4).

Emisia spectrului de fluorescenţă se prezintă sub formă de benzi (linii Stokes) şi nu este un spectru continuu, fiind în funcţie de mărimea moleculei. Fenomenul poate fi observat în orice stare de agregare a substanţei, fiind mai intens la lichide şi solide.

Fluorescenţa unui preparat microscopic poate fi clasificată în două categorii:

1. *Fluorescenţă primară, naturală sau autofluorescenţă* produsă de substanţe care se găsesc în mod natural în celule sau ţesuturi (lipofuscina, cromolipidele, fenilalanina, tirozina, adrenalina, noradrelanina, etc.).

2. *Fluorescenţă secundară sau provocată* indusă prin tratarea secţiunilor de ţesut cu fluorocromi (ex:acridin - orange); prin această metodă se pot detecta acizii nucleici, fibrele de colagen, reticulina şi elastice, mucinele, etc.

1.1.2.1. *Microscopia în lumina fluorescentă* foloseşte un microscop obişnuit cu următoarele particularităţi:

Scanned with OKEN Scanner

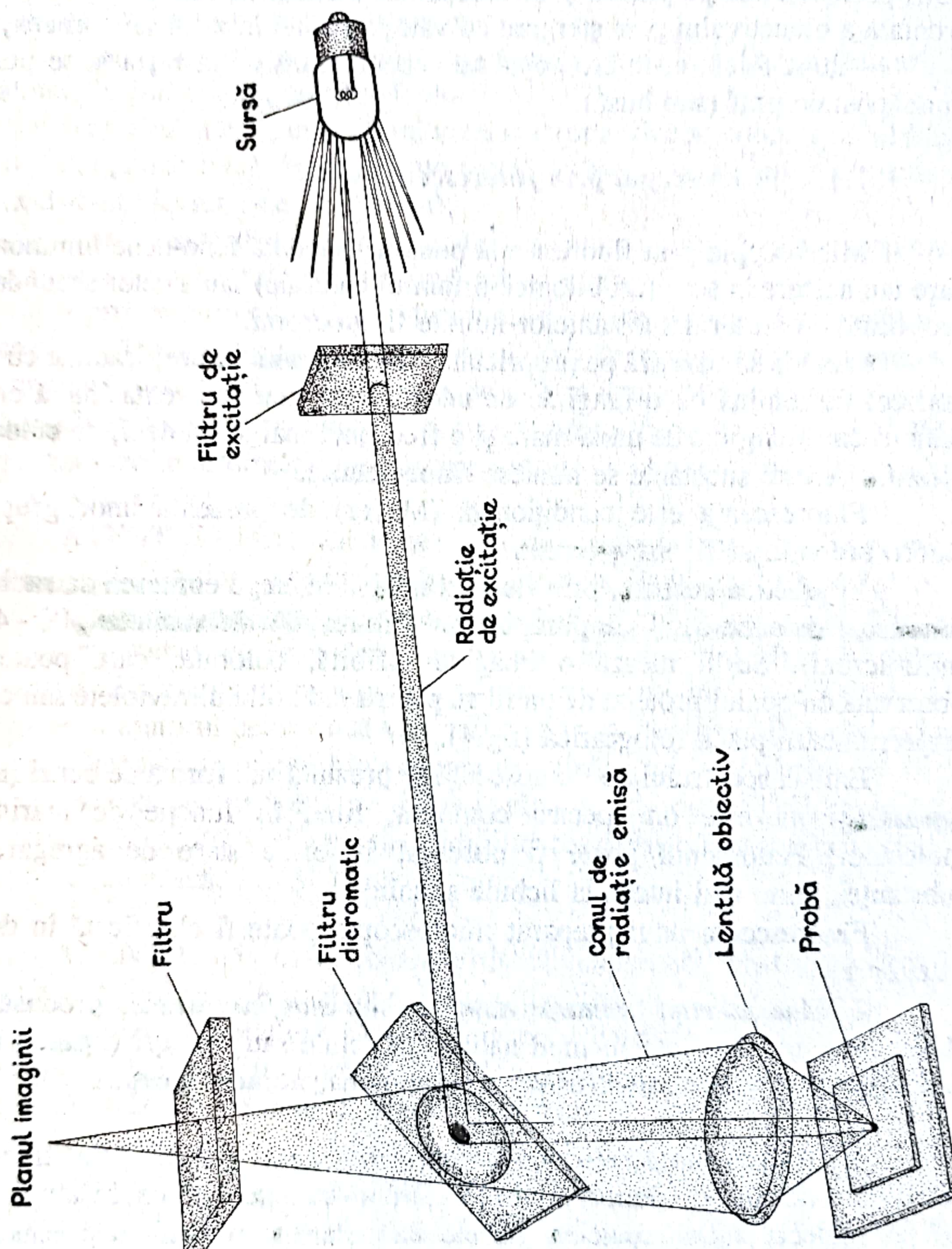


Fig.4. Reprezentarea schematică a microscopului prin fluorescență.

Scanned with OKEN Scanner

a. *sursa de lumină* este o lampă cu vapori de mercur (H.B.O. - 200 W, 3,3 - 3,9 A) care emite radiaţii U.V.;

b. *filtre de lumină* care opresc radiaţiile vizibile şi calorice; se folosesc două tipuri de filtre:

- *filtre de excitaţie* care au rolul de a opri toate radiaţiile în afara celor U.V.; se montează în talpa microscopului, între oglindă şi condensor;
- *filtre de protecţie* care protejează retina şi se montează între obiectiv şi ocular.

c. *condensatorii* utilizaţi în microscopia de fluorescenţă sunt de trei feluri: condensor U.V. cu apertură numerică 1,20, pentru câmp întunecat şi cu oglindă, care se montează în locul condensorului obişnuit.

1.1.2.2. **Tehnica de lucru**

- După montarea dispozitivelor menţionate, se porneşte lampa H.B.O. şi se aşează pe platina microscopului preparatul de examinat aplicat pe o lamă portobiect nefluorescentă;
- pentru găsirea câmpului şi punerea la punct a imaginii se procedează la fel ca în capitolul 1.1.1.4.;
- după examinare se întrerupe alimentarea de la reţea a lămpii H.B.O.

ATENŢIE - este interzis a se privi radiaţiile produse de lampa H.B.O. fără ochelari de protecţie U.V.; este interzisă manipularea carcasei în timpul funcţionării lămpii sau imediat după stingerea ei înainte de răcire întrucât există pericol de implozie.

1.1.2.3. **Aplicaţii practice**

Microscopia în lumina fluorescentă reprezintă o metodă cu o largă aplicabilitate în biologia celulară.

1. Cu ajutorul *fluorescenţei primare* pot fi identificaţi:

a. *pigmenţii*: porfirinele (fluorescenţa roşie), lipocromii sau pigmenţii carotenoizi (fluoresecţa verde), cromolipidele (fluorescenţa galben - verde), lipofuscina (fluoresecnţa roşu - brun);

b. *acizii aminați*: fenilalanina, tirozina, triptofanul (fluorescenta albastră);

c. *unele virusuri și bacilul Koch* emit o fluorescență verde strălucitor;

d. *dintele natural* este autofluoresecnt, proprietate prin care se deosebește de cel artificial;

e. *aminele biogene*: adrenalina. noradrenalina, serotonina (fluorescență verde).

2. Cu ajutorul *fluorocromării* cu acridin orange se pot identifica:

a. *acizii nucleici* ARN-ul - fluorescența roșie, A.D.N-ul - fluorescentă verde - galben;

b. *fibrele de colagen, elastice și de reticulină* - fluorescența verde;

c. *nucleii leucocitelor* au o florescență verde iar *citoplasma* lor și eritrocitele rămân opace;

d. *mucinele* - fluorescența verde.

Colorația cu acridin orange se mai utilizează în citodiagnosticul precoce al cancerului (studiul acizilor nucleici în condițiile unui proces tumoral).

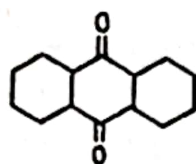
Cea mai importantă aplicație este *imunofluoresecța* care se bazează pe cuplarea unui acid cu un fluorocrom; prin fluorescența indusă poate fi identificată localizarea antigenelor în celule.

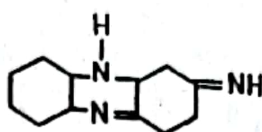
Microscopia prin fluorescență se deosebește de microscopia cu raze ultraviolete a cărui principiu de funcționare se bazează pe absorbția luminii ultraviolete de moleculele preparatului.

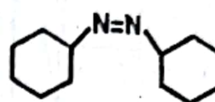
Microscopia în ultraviolet este asemănătoare **spectrofotometriei**, dar rezultatele sunt înregistrate fotografic. Razele ultraviolete trec prin lentile speciale și prin secțiunea preparatului de examinat dând, datorită unui fond diferit de absorbție, o imagine invizibilă pentru ochi dar care este înregistrată pe placa fotografică. Metoda este utilizată pentru detectarea acizilor nucleici, a bazelor purinice și pirimidinice ale nucleotidelor ca și la detectarea proteinelor ce conțin anumiți aminoacizi.

Scanned with OKEN Scanner

Grupările -CH, $-OCH_3$, $-CH_3$, -CN, măresc intensitatea fluorescenţei, altele ca -CO, -COO, $-NO_2$ o slăbesc, ceea ce reduce gama preparatelor care pot fi vizualizate printr-o astfel de tehnică. Prin metodele de preparare a secţiunilor se pot elimina astfel de inconveniente, lărgind astfel posibilitatea de utilizare a microscopiei prin fluorescenţă.

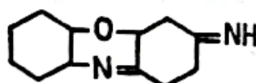

antrachinonă

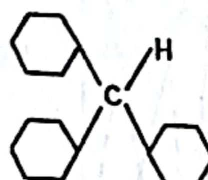

azină


azoic



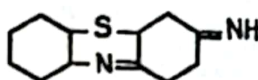
azometin

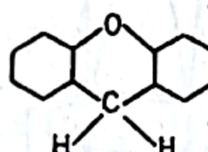

oxazină

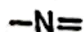

trifenilmetan



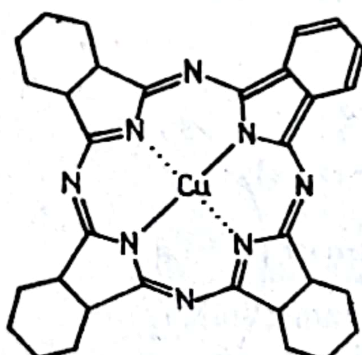
cetimină


tiazină


xantină



inadamin


ftalocianină

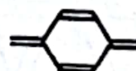

quinonă

Fig.5. Principalele grupări fluorofore

1.1.3. *Microscopia în contrast de fază*

Microscopia în contrast de fază utilizează un tip special de microscop

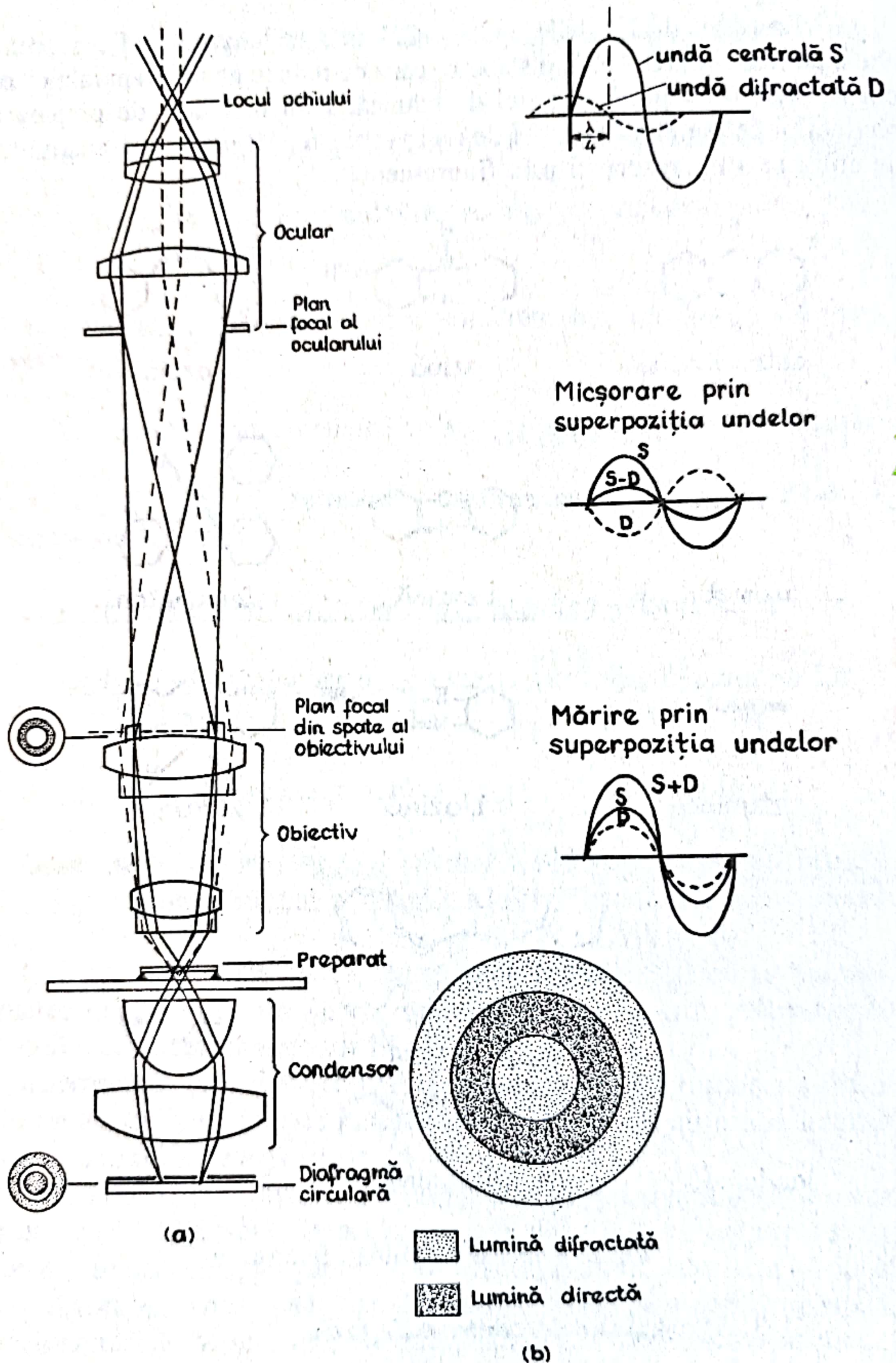


Fig.6. Schema de principiu a microscopului cu contrast de fază.

fotonic ce realizează contrastul unor obiecte de examinat, permiţând astfel studiul celulelor în stare vie, nefixate şi necolorate.

Aparatul pentru contrast de fază este un microscop obişnuit, cu următoarele particularităţi:

- **condensorul** are un diafragm inelar (un inel transparent într-un disc opac);

- **în obiectiv** se găseşte o placă sau inel de fază care are rolul de a modifica transmisia unei părţi din razele luminoase care formează imaginea câmpului microscopic (este un proces de defazare între razele luminoase care sunt transmise direct şi cele care sunt difractate de preparat)

Aceste două particularităţi permit modificarea sistemului optic, adică transformă diferenţele de fază invizibile pentru ochi în diferenţe de amplitudine care măresc contrastul elementelor preparatului.

1.1.3.1. **Tehnica de lucru**

- se montează condensorul de contrast de fază în locul condensorului obişnuit;
- în locul obiectivelor microscopului propriu-zis, se înşurubează obiectivele de contrast de fază;
- într-unul din tuburile oculare se introduce microscopul ocular;
- se aduce în axa optică a microscopului obiectivul 10x sau de puterea de mărire cu care dorim să examinăm; prin rotirea inelului condensorului facem să concidă cifra de pe aceasta, care corespunde aperturii lui, cu apertura obiectivului folosit;
- privind prin pupila de ieşire a ocularului, se reglează microscopul ocular (apropierea sau îndepărtarea lentilelor care compun ocularul) până în momentul când în câmpul vizual apar clar conturate două inele (a diafragmei condensatorului şi a inelului de fază);
- cu ajutorul a două cheiţe se acţionează asupra şuruburilor de reglare ale condensatorului până în momentul suprapunerii inelului din diafragma condensorului peste inelul din obiectiv - **reglajul se face pentru fiecare obiectiv în parte;**
- se înlocuieşte microscopul ocular cu ocularul propriu-zis;
- se recoltează fragmente din ficat de şobolan care se pun pe o placă de sticlă; cu o lamă portobiect se fac amprente prin apăsarea ei pe fragmentele de ficat peste care se pun 2-3 picături dintr-un mediu de cultură; se acoperă cu o lamelă după care se aşează praparatul pe platina microscopului;

- se pune la punct imaginea după tehnica descrisă la capitolul 1.1.1.4. şi se examinează preparatul.

1.1.3.2. Aplicaţii practice

Microscopia în contrast de fază permite:

- studiul celulelor în stare vie (celulele nefixate şi necolorate);
- scoate în evidenţă unele detalii de structură care nu se pot observa la microscopul fotonic obişnuit ca endocitoza, mişcarea cililor şi flagelilor, diviziunea celulară, etc.;
- studiază reacţiile celulare la diferiţi agenţi fizici sau chimici;
- studiază benzile cromosomilor.

Din microscopia cu contrast de fază au derivat:

- microscopia cu interferenţa care permite aprecierea cantitativă a masei unor componente tisulare;
- microscopia cu interferenţa diferenţială utilă pentru a evalua proprietăţile suprafeţei celulare şi a altor structuri biologice.

1.1.4. *Microscopia în lumina polarizată*

Prin această tehnică se obţin imagini ale unor constituienţi în care structurile examinate sunt **anizotrope**, acestea făcând ca viteza de propagare a luminii polarizate să varieze cu direcţia de propagare; mediile respective se numesc **birefringente**.

Birefringenta se poate clasifica:

a. în structuriele fibrilare (colagen, mielina, fibrele musculare striate, etc.) poate exista o *birefringentă pozitivă* când indicele de refracţie este mai ridicat în lungime decât în plan perpendicular şi *birefringentă negativă*, în caz contrar (fibrele nucleoproteice).

b. *birefringenţa cristalină* sau intrinsecă observată în sistemele sau moleculele în care ionii prezintă un aranjament asimetric regulat şi este independentă de indicile de refracţie a mediului de montare; se observă în structuri constituite din proteine sau lipide;

c. *birefringenţa de formă sau structură* apare atunci când particulele submicroscopice sunt orientate regulat într-un mediu cu indice de refracţie diferit;

d. *birefringenţa de tensiune* se observă la structurile izotrope care sunt supuse unei constrângeri mecanice şi se întâlneşte la nivelul muşchilor şi în ţesuturile embrionare;

Scanned with OKEN Scanner

e. *dicroismul* apare în momentul în care absorbţia unei lungimi de undă dată de lumina polarizată variază în funcţie de orientarea obiectului examinat. Aceste variaţii apar datorită diferenţelor de intensitate (amplitudinea luminii transmise de obiect). Unii coloranţi organici ca roşul de Congo sau thionină, pot induce dicroismul în unele structuri biologice datorită unei orientări prefernţiale a moleculelor.

1.1.4.1. **Microscopul cu lumina polarizată** are două dispozitive speciale numite: **polarizor** şi **analizor**; ele sunt constituite dintr-o peliculă de film polaroid sau dintr-o prismă Nicol în calcită.

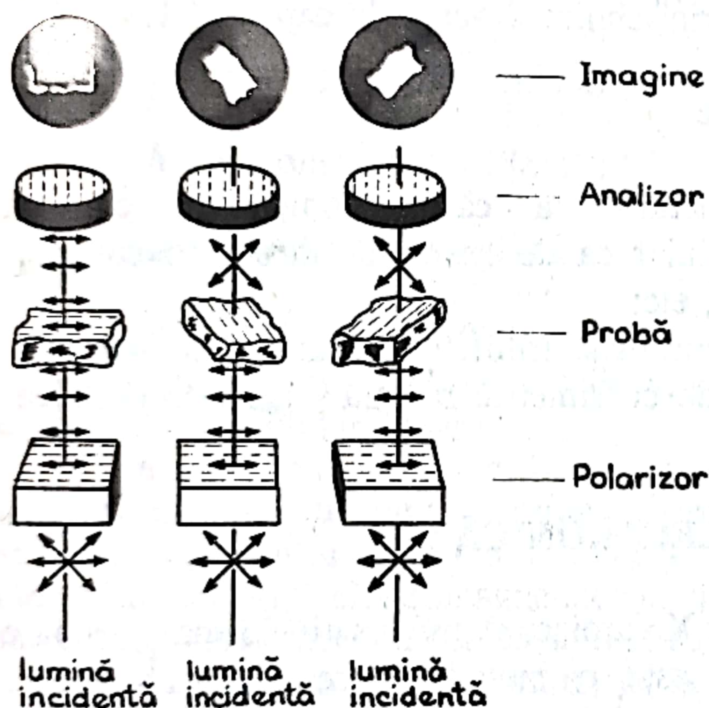


Fig.7. Schema optică a variaţiilor luminoase de maxim şi minim ale unui obiect anizotropic când este plasat între analizor şi polarizor şi rotit cu un unghi de $\pm 45^0$

Polarizorul se găseşte sub condensator iar analizorul se afla deasupra obiectivului.

Dacă planul de polarizare al analizorului este perpendicular pe cel al polarizorului, lumina nu va fi transmisă. Punând pe platina microscopului un preparat birefringent, planul de polarizare va devia datorită întârzierii provocate de întreruperea probei de examinat. Învârtim preparatul până când în câmpul microscopului apar puncte cu luminozitate maximă şi minimă.

1.1.4.2. **Tehnica de lucru**

- se coboară tubul microscopului apropiind obiectivul de condensor

până la obţinerea unei iluminări maxime şi uniforme a câmpului microscopic;

- se rotesc cei doi nicoli - analizorul şi polarizorul - până când se obţine întunecarea maximă în câmpul ocularului;

- pe platina microscopului se aşează o lamă port obiect pe care sunt lipite secţiuni din rinichi, intestin sau ficat, colorate după metoda topo - optica Romanyi şi col.1978 (materialul se fixează în formol, se secţionează la microtomul de congelare iar secţiunile se colorează cu o soluţie de albastru de toluidina la p.H. 4,5 urmând o post fixare cu fericianid de potasiu care are capacitatea de a se lega de lipidele şi glicoproteinele din structura biomembranelor);

- imaginea se face clară prin tehnica descrisă la capitolul 1.1.1.4.

1.1.4.3. Aplicaţii practice

a. se pot studia structurile a căror compoziţie chimică macromoleculară au un aspect liniar ca de exemplu fibrele de colagen, mielina, fibrele musculare striate, etc;

b. se utilizează pentru studiul structurilor: membrane biologice, etc.;

c. se evidenţiază structurile cu simetrie radială - granule proteice, lipide, colesterol.

1.2. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Metoda difracţiei cu raze X furnizează informaţii de mare valoare ştiinţifică pentru biologie, dar este o metodă extrem de laborioasă, interpretarea datelor fiind uşurată astăzi de utilizarea computerului. Forţarea barierelor invizibilului cu consecinţe aproape de nebănuit pentru ştiinţele biologice, s-a făcut după 1933, odată cu apariţia microscoapelor electronice.

Microscopul electronic constituie un exemplu de felul cum au fost aplicate în practică unele din marile descoperiri făcute în fizică la sfârşitul secolului trecut.

Aceste descoperiri au fost rodul a numeroase cercetări începute încă din 1750 iar printre ele, de o deosebită importanţă pentru construirea diferitelor tipuri actuale de microscoape electronice, se consideră următoarele: descoperirea razelor X în 1895 de către W.C.Röntgen, demonstrarea existenţei electronului în 1897 de către K.F.Braun, stabilirea caracterului ondulatoriu al electronilor şi asemănarea acestora cu fotonii în 1924 de către Louis de Broglie, stabilirea rolului de funcţionare ca lentilă a

Scanned with OKEN Scanner

câmpurilor electromagnetice cu simetrie axială asupra electronilor în 1926 de către Brusch, după ideea originală a lui Gabor. Toate aceste descoperiri au dus la fundamentarea opticii electronice ce stă la baza construirii microscoapelor electronice a acceleratoarelor de particule, a tuburilor cinescopice.

Fizicianul francez Louis de Broglie a emis în 1924 ipoteza că electronii au proprietăţi ondulatorii, adică le este asociată o undă, din acest punct de vedere asemănându-se cu fotonii. Această lungime de undă a electronului se numeşte "lungime de undă Broglie" şi este dată de formulă:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

λ = lungimea de undă a electronilor;

h = constanta lui Planck;

v = viteza electronului

m = masa electronului

Prin aceasta de Broglie a demonstrat asemănarea dintre radiaţiile electronice şi cele luminoase.

În toate tipurile de microscoape electronice, electronii generaţi de un tun electronic şi supuşi unor tensiuni de accelerare la alegere, sunt focalizaţi şi dispersaţi pentru a forma o imagine prin trecerea lor prin câmpuri electrostatice sau electromagnetice în funcţie de tipul constructiv de microscop. Lungimea de undă a fasciculului de electroni este aleasă în funcţie de tensiunea de accelerare, de la 0,0859 Å la 20 kV, la 0,0028 Å la 400kV, permiţând explorări în microcosmosul celular până la nivel molecular. Cele mai perfecţionate microscoape electronice aflate în exploatare în diferite laboratoare au rezoluţii garantate de 2-3 Å (în condiţii speciale 1,2 Å şi putere maximă de mărire pe placa fotografică de 800.000x).

Microscoapele electronice existente se împart după tipul de construcţie şi destinaţia lor în câteva grupe:

1. Microscoape electronice de transmisie, sau prescurtat TEM (Transmission Electron Microscope), utilizate pentru cercetări ultrastructurale.

2. Microscoape electronice de baleiaj, sau de tip SEM (Scanning Electron Microscope), folosite la studiul ultramorfologiei suprafeţelor cu ajutorul electronilor secundari sau reflectaţi.

	Tipul de imagine
- cu electroni secundari	relief geometric sau topografic potenţial de distribuţie rata de emisie electronică
- cu electroni reflectaţi	relief geometric compoziţie (numărul atomic mediu)
- cu electroni absorbiţi	compoziţie (numărul atomic mediu)
- cu forţe electromotrice	caracteristici fizice şi electrice ale semiconductorilor
- cu electroni transmişi	structura internă
- cu catodoluminiscenţă	distribuţia şi concentraţia materialelor fluorescente

3. Microscoape electronice de transmisie şi baleiaj, STEM (Scanning Transmission Electron Microscope), ce permit studiul ultrastrctural prin transmisie de electroni şi al suprafeţelor prin electroni secundari sau reflectaţi pe principiul SEM.

4. Microscoape electronice analitice de transmisie, TEAM - folosite pentru cercetări simultane ultrastructurale şi analitice.

5. Microscoape electronice sistemice - aparate cu funcţionalitate de sistem ce permit cercetări multiple simultan pe acelaşi preparat.

6. Microscoape electronice cu fotoemisie, PEM (Photoelectron Emission Microscope) cu aceleaşi aplicaţii ca şi cele de tip SEM.

7. Microsonde electronice - EPI (Electron Probe Instrument) - utilizate în analize elementare şi în studiul suprafeţelor.

8. Microscoape ionice cu emisie de câmp, FIM (Field Ion Microscope) - cu ajtorul cărora se poate vizualiza direct orientarea atomilor într-un material.

1.2.1. *Microscopul electronic de transmisie - TEM*

Microscopia electronică prin transmisie este determinată, pe de o parte de interacţiunea câmpurilor electromagnetice produse de lentile cu electronii, influenţând parametrii electronooptici şi, pe de altă parte de interacţiunea electronilor cu proba. Pentru ca electronii să poată tranversa proba este necesară o grosime suficient de mică a ei şi totodată energii de accelerare suficient de mari ale electronilor.

Din acest punct de vedere deosebim microscoape electronice de transmisie convenţionale CTEM, a căror tensiuni de accelerarea electronilor este cuprinsă între 20-125 kV (pentru probe biologice se folosesc în mod

Scanned with OKEN Scanner

curent tensiuni de 80 kV) şi microscoape de voltaj înalt HVEM, ale căror tensiuni ajung la 3 MV (3000 kV) şi chiar mai mult.

O secţiune transversală printr-un microscop electronic (fig.8) relevă o serie de elemente constructive ca: sistemul de vidare, tunul electronic, camera probei, ecranul fluorescent, dispozitivul de fotografiere şi blocurile speciale pentru alimentarea electrică. Datorită complexităţii sale tehnologice de a menţiune un fascicul de electroni cu un diametru de 1-2 μm în condiţiile de paraxialitate impuse de legile opticii pe o lungime de cel puţin un metru, putem distinge în cadrul microscopului electronic mai multe etaje, la fel de importante în funcţionarea lui. Într-o astfel de clasificare evidenţiem:

A. sistemul electronooptic;
B. sistemul electronic şi consola de comadă;
C. sistemul de vid.

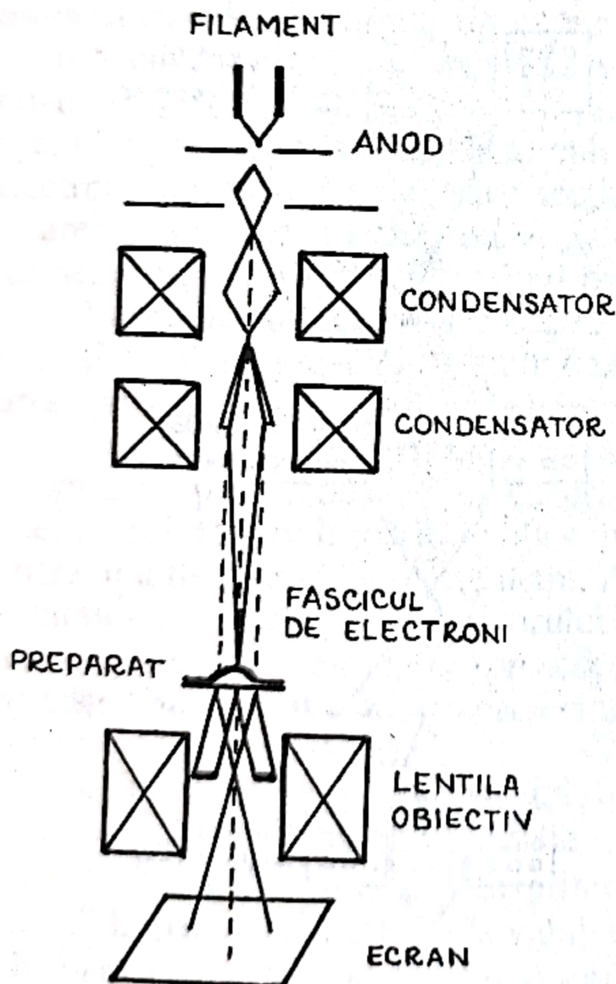


Fig.8. Schema de construcţie a unui microscop electronic de transmisie.

1.2.1.1. Sistemul electronooptic

Sistemul electronooptic sau sistemul responsabil de realizarea

imaginii, localizat în coloana microscopului, este alcătui din:

a. sistemul de iluminare;
b. camera pentru preparat;
c. sistemul de formare a imaginii;
d. camera de observaţie;
e. camera fotografică.

Principial, realizarea imaginii la microscopul electronic nu diferă de microscoapele obişnuite, fotonice (fig.9).

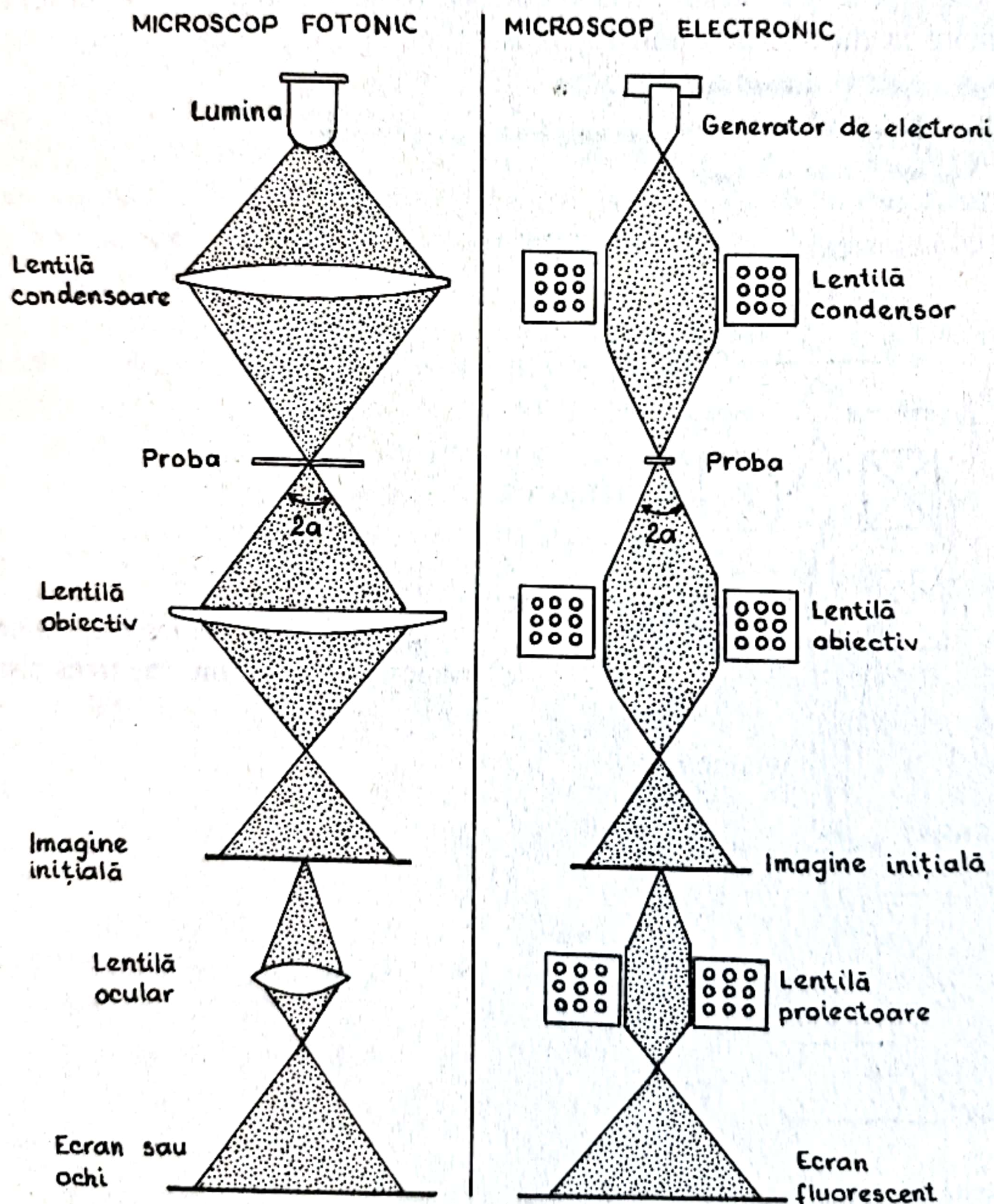


Fig.9. Realizarea comparativă a imaginilor în microscopia fotonică şi electronică.

Astfel, ca şi la microscopul fotonic, este necesară o sursă de radiaţii tot de natură electromagnetică, aşa numita radiaţie X a cărei lungime de undă este însă de 10^5 - 10^6 mai mică decât a radiaţiei verzi, aflată la jumătatea spectrului vizibil (λX = 0,1-0,01 Å, λV = 5500 Å), deci sub 0,1 Å ceea ce va permite detalieri morfostructurale de ordinul angströmului. Reamintim că scara de 1 Å este scara atomică.

a. *În componenţa sistemului de iluminare* intră: 1. tunul electronic şi 2. lentilele condensor, sistemul având rolul asigurării unei străluciri optime pentru diferite trepte de mărire la anumite grosimi ale preparatului.

Tunul electronic, adică ansamblul catod-filament, cilindru Wehnelt şi anod, este plasat în partea cea mai de sus a coloanei microscopului, în prelungirea cablului de înaltă tensiune. Filamentul, care joacă rol de **catod**, realizat din tungsten, wolfram sau hexaborură de lantan, sub forma literei V este sursa de radiaţii X şi se găseşte în vecinătatea cilindrului Wehnelt, electrodul cu rol de focalizare şi care se aseamănă întrucâtva cu cel al grilei dintr-o triodă, tetrodă sau pentodă. **Anodul**, în general, este confecţionat dintr-un disc metalic având un orificiu central cu diametru 3-5 mm, care dirijează electronii în axul optic al coloanei microscopului. Energia ridicată a electronilor necesară traversării secţiunilor preparatului se realizează prin aplicarea unei tensiuni de accelerare anod - catod, specifică tipului de microscop, dar şi naturii şi grosimii probelor.

Lentilele condensor servesc la focalizarea fasciculului electronic pe probă, şi constau dintr-un ansamblu de două lentile, prima cu distanţă focală scurtă care creează o imagine micşorată a sursei de electroni, deci a filamentului, a doua cu distanţă focală mărită, care transferă imaginea micşorată în planul obiect. În cazul utilizării microscopului la rezoluţii înalte, un rol decisiv îl joacă lentila condensor, fiindcă densitatea iluminării preparatului trebuie să fie foarte mare. Acest lucru se realizează prin treptele de iluminare prevăzute condensorului 2. Pentru compensarea aberaţiilor optice care sunt prezente şi în microscopia electronică, lentilelor condensoare li se adaugă sisteme de corectare şi compensare (deflectorul, stigmatorul şi compensorul de deplasare).

b. *Camera probei* este spaţiul din interiorul coloanei microscopului, dintre lentilele condensor şi lentilele de formare a imaginii, mărginită de două difragme. Accesul se face printr-o cameră ecluză pentru adaptarea presiunii la cea ambientală sau la vidul din coloană, iar proba, introducându-se într-un orificiu în lungul axului optic prevăzut în măsuţa preparatului. Secţiunile realizate dintr-un ţesut, sunt fixate pe grilă şi manipulate prin intermediul portobiectului în afara şi interiorul camerei, fluxul de particule lovind perpendicular suprafaţa secţiunilor în toată grosimea lor, producând

Scanned with OKEN Scanner

astfel difracţia razelor X. Fluxul iniţial, omogen, este astfel "modulat" la trecerea prin grosimea secţiunii, reţinând astfel informaţiile morfostructurale necesare.

c. *Sistemul de formare a imaginii* este realizat prin intermediul a trei sau patru lentile: obiectiv, intermediară (1 şi 2 la microscoapele mai perfecţionate) şi proiector, toate, ca şi cele condensor, fiind de tip electromagnetic.

Datorită faptului că radiaţiile X sunt sarcini electrice iar sticla nu le poate modifica traiectoria, problema construcţiei unor lentile pentru un

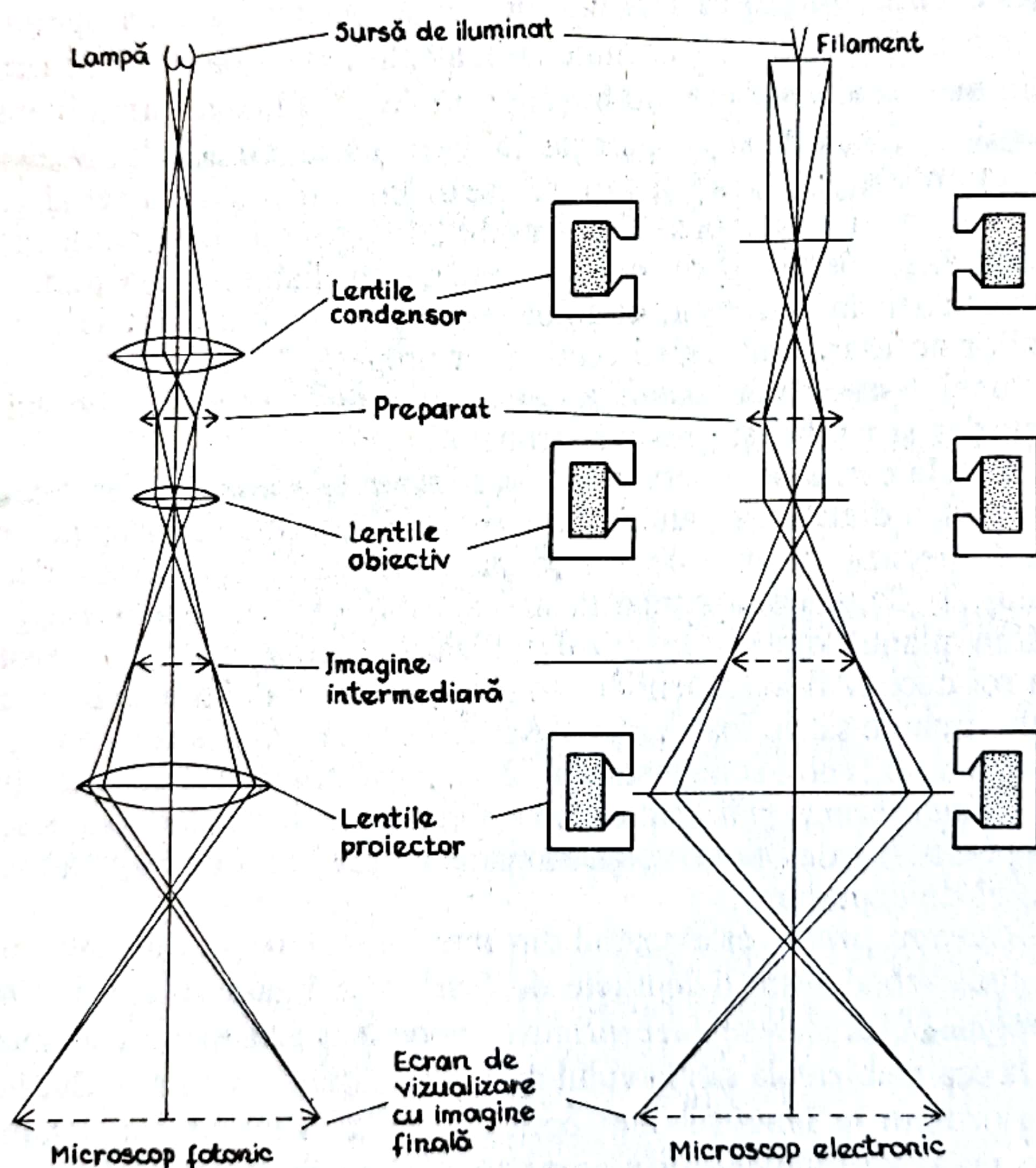


Fig.10. Mersul razelor luminoase şi a radiaţiilor X în microscopia fotonică şi electronică.

astfel de fascicul a fost rezolvată prin utilizarea unui câmp electromagnetic cu simetrie axială.

Problema de bază în cazul microscoapelor constă în asigurarea unei distanţe focale variabile a sistemului, care să permită vizualizarea diferitelor grosimi ale secţiunilor probei sau mărirea unor detalii de interes. În cazul microscoapelor fotonice acest lucru se realizează prin modificarea mecanică a poziţiei celor două lentile, (obiectiv şi ocular) una faţă de alta astfel încât sistemul să se poată alinia optic. În cazul utilizării radiaţiei X, atât câmpul electric cât şi cel electromagnetic realizat cu magneţi naturali, deşi pot constitui lentile, ele nu pot să modifice distanţa focală, lucru în schimb perfect posibil cu ajutorul solenoizilor, prin modificarea curentului străbătut în circuit. Din punct de vedere tehnologic există o diversitate de realizare a lentilelor electromagnetice, piesele polare fiind detaşabile sau monobloc. Traiectoria razelor X prin lentilele microscopului se poate urmări în figura 10, imaginea realizându-se pe un ecran fluorescent, în urma interacţiunii electronilor difractaţi de către probă cu substanţa fluorescentă a ecranului.

d. *Camera de observaţie*, situată la nivelul panoului de comandă este prevăzută cu trei ferestre de vizualizare a imaginii, fiind în partea superioară în legătură cu lentila proiector, iar în partea inferioară cu caseta fotografică. În interiorul ei se află ecranul care este format dintr-o placă metalică circulară acoperită cu o substanţă fluorescentă, cum ar fi monocristale de sulfură de zinc şi cadmiu.

e. *Camera fotografică* se găseşte sub camera de observaţie şi este prevăzută cu o casetă cu 12 sau 24 de plăci fotografice a căror emulsie este specifică radiaţiei X. Camera are un sistem de vidare fiind de fapt în conexiune directă cu coloana microscopului. Astfel, este posibilă înmagazinarea imaginilor, mărirea şi prelucrarea lor ulterioară prin tehnicile fotografice cunoscute, îmbunătăţind deci calitatea informaţiei.

1.2.1.2. Sistemul electronic şi consola de comandă

Sistemul electronic, deosebit de important, este alcătuit în principal la microscoapele moderne din două blocuri: unul responsabil de realizarea unei tensiuni înalte, bine stabilizate, care să permită obţinerea rezoluţiei propuse, sub 10 Å, al doilea fiind responsabil de realizarea unui curent bine stabilizat pentru alimentarea lentilelor, micşorând pe cât posibil aberaţiile lor. Evident că accesarea luminii, rezoluţiei şi clarităţii imaginii se realizează electronic prin consola de comandă situată pe un panou frontal.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1.3. **Sistemul de vid**

Pentru a împiedica interacţiunile dintre radiaţiile X şi moleculele de aer, deci obţinerea unui fascicul coerent cu o deplasare perfect rectilinie până la ecranul fluorescent, este necesară realizarea în coloana microscopului a unui vid înalt de aproximativ 10^{-4} 10^{-6} torr şi chiar mai mult. Sistemul de vidare conţine una sau două pompe rotative care asigură un vid preliminar şi una de difuzie care ridică vidul la cotele cerute de rezoluţia microscopului. Totodată, sistemul conţine o serie de supape manuale şi automate cu rol de protecţie în timpul utilizării instrumentului.

1.2.2. *Microscopul electronic cu voltaj înalt*

Microscopul electronic cu înalt voltaj (HVEM) este un microscop de transmisie ce foloseşte o tensiune mai mare de 300.000 V, ajungând, la unele tipuri, până la 3-5 MeV.

Primul microscop electronic cu o tensiune de accelerare de 1 milion de volţi (1 MV) a fost construit în 1960 de către Dupony şi Perrier în laboratorul de optică electronică din Toulouse, această realizare constituind punctul de plecare pentru o nouă generaţie de microscoape electronice.

În ciuda complexităţii lor şi a costului ridicat ele s-au dovedit extrem de utile, deoarece într-un astfel de microscop electronii pot trece prin preparate care au grosimi de 14 μm, fiind posibil ca secţiuni de grosimea celor realizate de un microtom obişnuit să fie uşor examinate, uneori fără a mai fi colorate. De asemenea se pot cerceta celule întregi fără a fi incluzionate, iar Porter şi Fotino (1974) au demonstrat că în aceste condiţii se poate realiza mai uşor reconstituirea tridimensională a structurilor şi evidenţierea enzimelor.

Folosindu-se microscopul electronic Toulouse 3000 cu o tensiune de accelerare de 1 MV s-au obţinut fotografii ale unor bacterii, ale moleculelor de acizi nucleici. De asemenea, utilizându-se un alt tip de microscop electronic cu voltaj înalt JEM 1000 D, s-a reuşit urmărirea evoluţiei cromozomilor în meioză. Rezultatele obţinute până în prezent în cercetarea bilogică arată că microscopia de înalt voltaj va avea mari perspective în viitor.

Acest tip de microscop se bazează pe acelaşi principiu constructiv ca şi la microscoapele convenţionale de 100 kV. Înalta tensiune utilizată presupune însă realizarea unei coloane cu mult mai înaltă, iar înlăturarea vibraţiilor din coloană necesită şi realizarea unei fundaţii cu mult mai stabilă decât în mod obişnuit. Astfel, întreg ansamblul poate atinge înălţimea unei

clădiri pe trei nivele. La fel, lentilele sunt mai puternice iar curentul absorbit de ele şi de sistemul de accelerare a fluxului conduc la utilizarea unor blocuri de alimentare electrică mai perfecţionate şi mai costisitoare. Sunt necesare de asemenea, măsuri de securitate sporite pentru evitarea iradierii personalului.

1.2.3. *Microscopul electronic analitic de transmisie - TEAM*

TEAM este format dintr-un microscop electronic de transmisie de înaltă rezoluţie, la care se ataşează un microanalizor de raze X din clasa spectrometrelor.

Noutatea adusă de TEAM constă în posibilitatea de a culege şi informaţii cu privire la elementele chimice cuprinse în preparat, pe lângă cele de ordin morfo-structural, prin difracţie de electroni conţinute de CTEM.

El funcţionează pe baza analizei lungimii de undă dispersate, sau mai nou pe baza analizei energiei dispersate. Astfel, bombardarea printr-un fascicul de electroni a unor preparate determină emisia de radiaţii X a căror lungime de undă este caracteristică atomilor bombardaţi; spectrometrul măsoară aceste lungimi de undă, permiţând determinarea compoziţiei chimice elementare a unor volume extrem de mici de materie.

Până în prezent s-au conturat câteva direcţii de cercetare, prin utilizarea TEAM, cum ar fi:

1. localizarea elementelor chimice existente în condiţii normale în ţesuturi, în special a ionilor de Na^+ şi Ka^+;

2. detectarea unor elemente în anumite stări patologice cum ar fi de ex.: intoxicaţiile sau carenţele fiziologice;

3. aprecierea distribuţiei unor elemente poluante în diferite verigi ale lanţului bilogic;

4. identificarea unor reacţii chimice între diferite elemente pe baza analizării unor precipitate ce se formează în ţesuturi.

1.2.4. *Microscopul electronic de baleiaj - SEM*

SEM spre deosebire de TEM furnizează imagini tridimensionale ale suprafeţelor probelor cercetate, ale căror dimensiuni sunt de ordinul centimetrilor, dar nu pot furniza informaţiile morfo-structurale ce se regăsesc în grosimea materialului.

Formarea imaginii (fig.11) se bazează pe principiul emisiei

electronilor secundari, reflectaţi în urma bombardării probei de către fasciculul primar de radiaţii X.

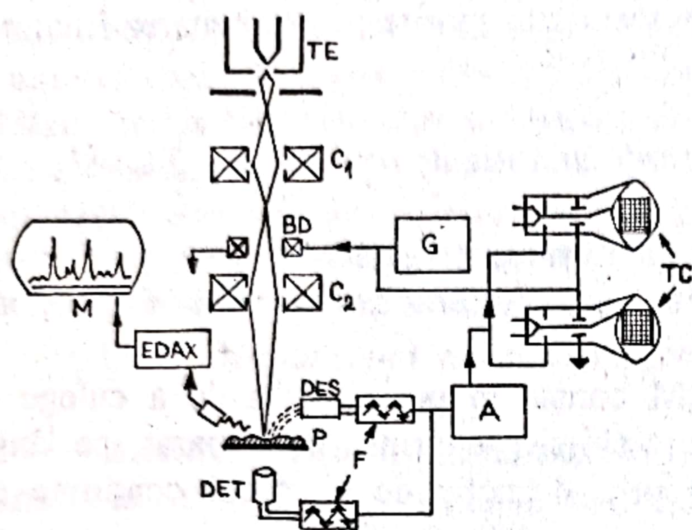


Fig.11. Schema de organizare a microscopului electronic de baleiaj - SEM)

De această dată, fasciculul de electroni cade sub un anumit unghi pe probă producând reflexii sub unghiuri diferite în funcţie de incidenţa particulei cu zona de impact. Spotul de radiaţii baleiază în timp întreaga suprafaţă a probei, astfel încât pe ecran apare imaginea, la scară dorită, a zonei scanate.

Constructiv, SEM are în plus un detector al electronilor secundari emişi în urma interacţiunii cu suprafaţa probei. Curentul produs de acesta este modulat şi trimis în final spre blocul de baleiere al uni tub cinescopic dintr-un monitor.

Pregătirea probei pentru analiza cu un astfel de microscop este mai uşoară, nefiind necesare realizarea de secţiuni ultrafine. Pe de altă parte, rezoluţia este mai mică cam de 10 ori faţă de TEM. Condiţia principală impusă probelor examinate printr-o astfel de metodă este ca suprafaţa acestora să fie conductoare pentru evitarea acumulării de sarcini electrice pe suprafaţă. În cazul unei analize calitative, probele sunt tăiate şi polizate mecanic sau chimic. În cazul unei probe la care se impune studiul morfostructural de suprafaţă sau al compoziţiei, suprafaţa probei trebuie pregătită în prealabil. Totodată, probele neconductoare se acoperă cu un strat fin de ordinul de Å grosime, depus prin evaporare în vid, stratul realizând astfel neutralitatea electrică a suprafeţei impusă de condiţiile specifice de lucru în microscopia de baleiaj.

Pentru obţinerea unei depuneri uniforme a stratului în cazul probelor

Scanned with OKEN Scanner

a căror suprafaţă este rugoasă, acestea sunt supuse rotirii sub anumite unghiuri în tot timpul depunerii. Stratul depus este o vopsea pe bază de argint coloidal, observarea fiind ameliorată prin depunerea de straturi succesive de Au şi Pd, grosimea totală nedepăşind 1000 de Å. În cazul probelor biologice care conţin apă şi lichide volatile şi care sunt supuse evaporării în timpul baleierii datorită vidului existent în coloană, este necesară, în prealabil, ca şi în microscopia de transmisie, deshidratarea şi eventual îngheţarea lor, înlăturând, astfel, efectele nedorite.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

II. *METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA FOTONICĂ*

Studiul structurii celulelor eucarioate, de o deosebită complexitate morfo - funcţională, este posibil de realizat doar într-o mică măsură cu microscopul fotonic deoarece are o putere de rezoluţie redusă.

Acest studiu necesită utilizarea unor tehnici speciale de citomorfologie, citochimie, citoenzimologie, etc., a căror atribut este conservarea integrităţii structurale în condiţii cât mai apropiate de cele existente în organismul viu.

Examinarea morfo - funcţională a celulelor se face pe **preparate microscopice.** Un preparat microscopic este format din: secţiuni subţiri, plane şi transparente, de organe sau ţesuturi, frotiuri sau amprente de organe, aşezate pe o lamă de sticlă sau portobiect cu laturi paralele şi dimensiunile 76/26 mm şi 1,5 - 2 mm grosime, protejate cu o lamelă de sticlă de formă pătrată sau dreptunghiulară, cu dimensiuni variabile de 18/18, 22/22, 22/32 mm şi o grosime de 0,16 - 0,18 mm. Înainte de a fi folosite, atât lamele cât şi lamelele vor fi bine curăţate şi degresate (detergenţi, alcool etilic).

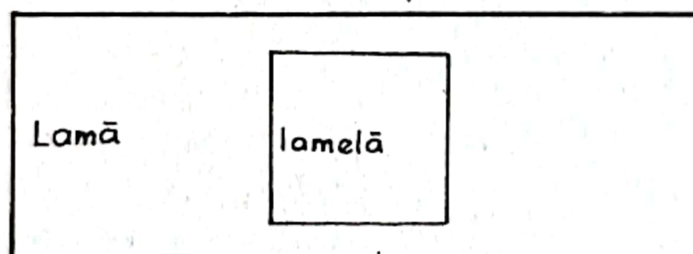


Fig.12. Lamela şi lama portobiect

Preparatele microscopice se clasifică în:

1. *Preparate permanente* sau durabile care permit un studiu amănunţit al celulelor pe secţiuni fixate şi colorate; ele rezistă în timp şi se pot realiza prin:

a. metoda efectuării secţiunilor fine;

b. metoda etalării metarialului bilogic în monostrat (frotiu, amprente de organe)

Obţinerea unor preparate microscopice permanente necesită efectuarea unor timpi operatori succesivi, fiecare din ei având o influenţă hotărâtoare asupra reuşitei finale. În ordinea executării lor, aceştia sunt: recoltarea,

fixarea, spălarea (decalcifierea în cazul ţesuturilor dure), includerea, secţionarea, aplicarea secţiunilor pe portobiect, colorarea, montarea şi etichetarea. În funcţie de tehnica aleasă, succesiunea acestor timpi poate fi modificată, unii dintre ei putând fi omişi.

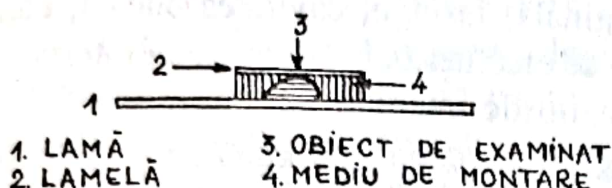


Fig.13. Elementele unui preparat microscopic permanent

Dacă unele greşeli în efectuarea secţionării, colorării sau montării mai pot fi ulterior corectate parţial, recoltarea, fixarea şi includerea incorect făcute, compromit definitiv calitatea preparatelor microscopice.

2. *Preparate extemporanee*, proaspete sau temporare.

2.1. METODA EFECTUĂRII SECŢIUNILOR FINE

Realizarea unui preparat microscopic permanent prin metoda efectuării secţiunilor fine necesită o anumită tehnică care se desfăşoară în următoarele etape: recoltare, fixare, spălare, includerea, secţionarea, etalarea materialului bilogic pe lamă, colorarea, montarea şi etichetarea.

2.1.1. *Recoltarea*

Recoltarea reprezintă unul din timpii cei mai dificili din tehnica de biopsie celulară deoarece după sacrificarea animalului de experienţă sau obţinerea unui fragment de ţesut sau organ prin bipsie sau alt act operator, cu maximum de operativitate trebuie să confecţionăm o piesă de material bilogic care să conţină populaţia de celule necesară studiului propus.

Recoltarea materialului bilogic din organismele vii se poate efectua prin:

a. *Biopsie* - se prelevă prin **secţionare** un fragment mic de ţesut (ex. bipsie ganglionară, cutanată, musculară).

b. *Puncţie bioptică* - se obţin fragmente dintr-un ţesut cu ajutorul unui tub ascuţit - trocar - ex. puncţie sternală pentru obţinerea unor fragmente din măduva hematopoietică, puncţie hepatică, renală, ganglionară.

c. *Aspiraţie endoscopică* - pentru recoltarea cu ajutorul unui endoscop

a produselor bilogice existente în cavităţile naturale (ex. endoscopie gastrică).

d. *Puncţia cavităţilor* - pentru obţinerea secreţiilor normale sau patologice ca: lichide pleurale, peritoneale, oxitice, lichid cefalorahidian.

e. *Raclarea mucoaselor* - (supeficială sau profundă) pentru recoltarea materialului din cavitatea uterină, vaginală, faringe, cavitatea bucală, etc.

f. *Prelevarea intraoperatorie* - se efectuează în timpul unei intervenţii chirurgicale pentru stabilirea unui diagnostic imediat.

g. *Recoltarea de material bilogic de la cadavrele umane* - secţionarea unor fragmente de organ pentru examinarea lor.

h. *Recoltarea de la animalele de experienţă* sacrificate în acest scop.

Deasemenea pentru studiul unor aspecte ale activităţii celulare (mişcarea, fagocitoză, diviziune celulară etc.) se realizează şi preparate din culturi celulare.

Recoltarea se face pe o placă de plută sau de P.V.C. foarte curată; se folosesc pense fine, fără dinţi, care se manipulează cu delicateţe pentru a nu strivi preparatul; în aceleşi scop, la fasonarea pieselor se folosesc lame de ras noi, degresate.

În cazul în care ţesutul are o consistenţă moale (sistem nervos central, testicol) şi fasonarea pieselor nu se poate face fără riscul strivirii lor, se preferă fixarea unor fragmente mai mari timp de 1-2 ore, perioadă în care structurile superficiale se întăresc şi permit obţinerea lor.

Piesele astfel recoltate trebuie să aibă feţele plane şi paralele iar grosimea lor nu trebuie să depăşească 1-4 mm, aceasta facilitând pătrunderea mai rapidă a fixatorului şi evită apariţia alterărilor post-mortem.

2.1.2. *Fixarea*

Fixarea, timp obligatoriu în realizarea preparatelor permanente, are drept scop esenţial conservarea, (imobilizarea) constituienţilor celulari într-o stare cât mai apropiată de starea vie şi de pregătirea lor în vederea manevrelor ulterioare (includere, colorare). Aceasta depinde în primul rând de proteine, principalii constituienţi ai materiei vii ceea ce înseamnă că un bun fixator histologic trebuie să fie în primul rând un fixator al proteinelor.

Mecanismul intim al fixării proteinelor nu este încă perfect cunoscut. Se cunoaşte însă faptul că, fixatorii histologici determină o coagulare sau o insolubilizare a proteinelor şi în majoritatea cazurilor, un anumit grad de polimerizare a acestor elemente organice. De ex. formaldehida, element principal al fixatorilor uzuali se combină cu numeroase grupări funcţionale a

moleculelor proteice, formează legături între moleculele învecinate şi constituie astfel edificii macromoleculare insolubile.

O altă consecinţă importantă a acestei cuagulări a proteinelor este blocajul reacţiilor enzimatice pe care le antrenează, împiedicând astfel distrugerea autolitică a ţesuturilor.

Fixarea trebuie privită diferit în funcţie de:

1) gradul conservării morfologice pe care dorim să-l obţinem: fixarea se realizează în mod diferit pentru microscopia electronică faţă de cea fotonică; în primul caz trebuie păstrate relaţiile între constituienţii chimici ai celulei la scară moleculară ceea ce nu este indispensabil în acelaşi grad pentru microscopia fotonică;

2) de natura constituienţilor chimici ce trebuie conservaţi: anumite edificii macromoleculare sunt uşor de conservat (este cazul constituienţilor celulari fundamentali cum sunt proteinele) în timp ce alţii, foarte labili, sunt extrem de dificili de fixat (de ex. ozele sau oligozaharidele);

3) de volumul fragmentelor tisulare ce trebuie conservate: problema fixării unui frotiu celular este diferită de cea a fixării unui organ de şoarece sau a unui encefal uman; viteza de pătrundere a fixatorului devenind în acest caz elementul esenţial al fixării;

4) de tipul recţiilor de culoare sau histochimice pe care dorim să le efectuăm: nu vom fixa în acelaşi fel când vom folosi o coloraţie simplă "topografică" sau vom încerca decelarea lipidelor sau enzimelor.

Un bun fixator citologic trebuie să întrunească următoarele calităţi

- să pătrundă rapid în ţesut;
- să producă o retracţie cât mai mică a pieselor evitând modificarea taliei, formei şi raporturilor dintre celule;
- să permită o bună includere;
- să permită o bună colorare a structurilor a căror evidenţiere se doreşte;
- fixarea se realizează prin:
    1) agenţi fizici
    2) agenţi chimici

2.1.2.1. Fixarea prin agenţi fizici

În acest capitol se încadrează metodele ce folosesc căldura, desicarea la temperaturi scăzute (congelare-desicare sau criodesicare), desicarea la temperatura laboratorului, metodele ce presupun răcirea preparatului bilogic urmată de acţiunea unui fixator lichid (congelare-substituţie), răcirea

nereprezentând un procedeu de fixare, ea având ca efect oprirea proceselor de autoliză; această oprire a modificărilor postmortem încetează însă odată cu revenirea la temperatura laboratorului, ceea ce face imperios necesară completarea cu o fixare în adevăratul sens al cuvântului.

2.1.2.1.1. Fixarea prin căldură

Acest tip de fixare mult depăşit în prezent de alte metode, îl cităm doar pentru importanţa sa istorică. Este una din cele mai vechi metode de fixare; principiul ei este coagularea proteinelor sub efectul căldurii. Însă, chiar autorii clasici au observat inconvenientele majore pe care le prezintă din punct de vedere morfologic acest tip de denaturare a compuşilor protidici. Una din principalele aplicaţii ale fixării prin căldură, a fost indrodusă de Erlich în 1877, şi se referă la pregătirea frotiului de sânge pentru colorarea cu amestecul triacid cunoscut.

2.1.2.1.2. Fixarea prin desicare la temperatura laboratorului

Desicarea rapidă la temperatura laboratorului este folosită pentru pregătirea frotiului de sânge destinat colorării cu metodele hematologiei morfologice. Ea poate fi aplicată şi pentru frotiuri de măduvă osoasă şi amprentele de organe. În afara acestor situaţii particulare, indicaţiile sale sunt destul de limitate, nefiind vorba de o veritabilă fixare. Denaturarea proteinelor obţinută astfel nu merge până la pierderea solubilităţii lor în apă, astfel că desicarea trebuie totdeauna completată în momentul colorării frotiurilor prin acţiunea unui alt fixator (ex. alcool metilic ce se foloseşte ca solvent pentru eozinatul de albastru de metilen din compoziţia colorantului May-Grümwald).

2.1.2.1.3. Fixarea prin desicare la temperatură scăzuta

A fost introdusă în 1890 de Altman iar perfecţionările acestei metode de fixare făcute de Gresh (1932) au dus la rezultate citologice spectaculare (Bensley şi Gersh - 1933).

Congelarea - desicarea sau criodesicarea nu este o fixare în sensul propriu al termenului pentru că ea nu determină denaturarea proteinelor tisulare. Principiul ei este foarte simplu, bazându-se pe eliminarea prin sublimare a apei conţinute în piese, răcire la o temperatură inferioară de 0^0 şi plasarea într-o incintă unde presiunea este inferioară valorii de 4,6 mm Hg

(coloană de mercur). Numeroasele aplicaţii industriale ale metodei justifică numărul mare de lucrări consacrate principiilor fizice şi realizării tehnice a acestei metode. Metoda a fost pusă la punct în 1958 de către Neumann iar lucrările lui Lison şi Pearse (1960) trec în revistă datele esenţiale în ceea ce priveşte locul criodesicării în tehnica citologică. Din punct de vedere tehnic metoda fixării prin criodesicare are trei etape:

1. *congelarea piesei* care are drept scop principal oprirea rapidă a tuturor reacţiilor vitale, ceea ce se, poate obţine prin folosirea unei temperaturi de -50^0 - -70^0; la acestă temperatură se obţine oprirea reală a tuturor recţiilor enzimatice ce s-ar putea derula în interiorul ţesuturilor.

Congelarea reprezintă etapa crucială a acesti metode: - defecţiunile acestei etape pot duce la artefacte grosiere reticularea ţesuturilor ce ar face piesa recoltată inutilizabilă;

2. *desicarea sub vid* - sublimarea apei ce are drept scop eliminarea apei, prezentă în mare parte sub formă de cristale de gheţă conţinute în interstiţiile ţesutului.

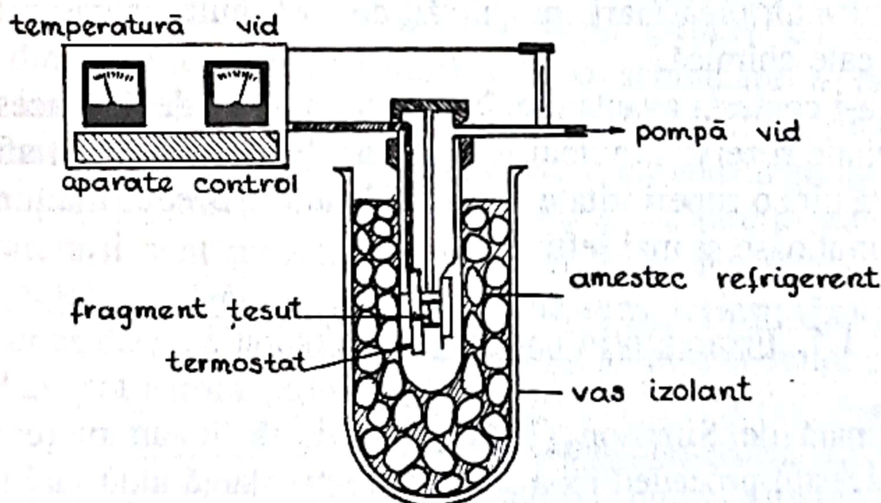


Fig.14. Schema aparatului de congelare-desicare

3. *tratamentul ulterior al piesei* - piesa odată deshidratată nu prezintă la examenul microscopic nici o retracţie comparativ cu starea proaspătă, proteinele tisulare sunt seci, dar nu denaturate. Urmează apoi impregnarea şi includerea în parafină.

2.1.2.1.4. Avantaje şi inconveniente. Indicaţii şi contraindicaţii

Avantajele teoretice ale criodesicării sunt evidente existând însă unele limite ale acestei metode şi contraindicaţii. Este vorba înainte de toate de necesitatea folosirii unor piese foarte mici. Apoi, există riscul compromiterii structurilor datorită formării, în momentul congelării ţesuturilor, a unor cristale de gheaţă de talie superioară limitei puterii de separare a microscopului fotonic. O "reticulare" a ţesuturilor face piesa aproape inutilizabilă şi este imposibil de evitat dacă dimensiunile preparatului depăşesc 2 mm şi chiar în cazul în care dimensiunile corespund tuturor exigenţelor, acestă reticulare este foarte dificil de evitat în multe cazuri.

Lison, în 1960, arată că anumite ţesuturi (ficat, pancreas, tegument) sunt bine conservate prin acestă metodă, în timp ce altele (rinichi, intestin) se conservă satisfăcător; conservarea devine necorespunzătoare în cazul testicolului, ţesutului nervos, măduvii osoase şi ganglionilor limfatici. Deşi din punct de vedere morfologic rezultatele criodesicării pot rivaliza uneori cu cele obţinute folosind fixarea prin agenţi chimici, exigenţele sale materiale sunt mult prea mari, preţul său de cost mult mai ridicat decât cel al fixării pe cale chimică.

Fără a-i contesta avantajele, în prezent se consideră că acestă metodă de fixare trebuie rezervată numai unor cazuri bine definite, în afara cărora ea nu prezintă nici o superioritate raportată la alte procedee mult mai rapide, mai puţin minuţioase şi mai ieftine.

2.1.2.1.5. Fixarea prin congelare - substituţie

Imaginată de Simpson (1941) şi utilizată de un mare număr de cercetători, acestui procedeu i s-a acordat o importanţă mult mai mică decât criodesicării. Principiul său este apropiat de cel al criodesicării şi avantajele sunt asemănătoare.

Primul timp al acestei metode este asemănător cu cel al criodesicării: piesele foarte mici sunt congelate cu aceleaşi precauţii dar deshidratarea se bazează pe cu totul alt principiu. Ţesuturile congelate sunt transferate în etanol, eter sau glicol răcit la o temperatură cuprinsă între -20^0 şi -50^0. În aceste condiţii se stabileşte un echilibru între faza solidă reprezentată de gheaţă şi o fază lichidă conţinând apă şi solvent organic în proporţii variabile în funcţie de temperatură. De ex. la -20^0 echilibrul se realizează pentru amestecuri apă-etanol conţinând în jur de 30% apă. Când excesul de solvent este mare, toată apa poate fi astfel extrasă din piesă, difuzia moleculelor de

apă în excesul de solvent asigurând o deshidratare progresivă, fără ca apa ţesuturilor să revină în starea lichidă. Din punct de vedere practic acestă metodă este mult mai simplă în raport cu criodesicarea.

Fără a oferi toate garanţiile teoretice ale criodesicării, metoda congelării-substituţie permite obţinerea unor preparate bune din punct de vedere morfologic.

2.1.2.2. Fixarea prin agenţi chimici

Dintre toţi fixatorii fizici trecuţi în revistă numai căldura asigură o fixare în adevăratul sens al cuvântului, adică o denaturare a proteinelor tisulare încât în majoritatea cazurilor, se impune intervenţia agenţilor chimici susceptibili a asigura acestă denaturare. Înţelegem astfel rolul esenţial pe care îl joacă fixatorii şi amestecurile fixatoare chimice.

Printre criteriile de clasificare a fixatorilor chimic se iau în consideraţie în primul rând acţiunile lor asupra proteinelor, deorece denaturarea proteinelor reprezintă piatra de temelie a fixării. În afara denaturării proteinelor, fenomen ce merge în paralel cu o serie de modfificări din care cea mai vizibilă este o schimbare a caracterelor solubilităţii, lanţurile care reprezintă proteinele de structură sunt depliate; apar legături intermoleculare noi ce conferă ansamblului o anumită rigiditate; o serie de grupări pot deveni active în timp ce altele care puteau reacţiona înaintea denaturării sunt mascate acum. Cum dealtfel a şi fost remarcat, denaturarea nu este un fenomen uniform, totdeauna acelaşi; fixatori diferiţi pot fi cauza unor denaturări diferite, ce vor modifica o anumită proprietate a proteinelor asupra cărora acţionează.

În funcţie de tipul de acţiune asupra ovalalbuminei (floculare sau coagulare) se poate face o clasificare a agenţilor chimici fixatori în:

1. *coagulanţi* (metanol, etanol, acetonă, acid nitric, acid clorhidric, trioxidul de crom, etc.)

2. *necoagulanţi* (acid acetic, tetraoxid de osmiu, bicromat de potasiu, formaldehida).

Deasemenea, trebuie avute în vedere acţiunile agenţilor chimici fixatori şi asupra glucidelor şi lipidelor tisulare, gradul de penetrare în interiorul pieselor, retracţia ţesuturilor sub acţiunea lor, modificările morfologice ale organitelor, etc. Numărul fixatorilor chimici simpli este relativ mic în comparaţie cu varietatea amestecurilor fixatoare. Vom trece în revistă în continuare câţiva dintre fixatorii simpli şi amestecurile fixatoare cel mai frecvent utilizate.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.2.2.1. Fixatori simpli

a. *Etanolul* - lichid incolor, uşor miscibil cu apa, uneori utilizat ca fixator la concentraţii variind între 70% - 100%. Este utilizat în special în scopul fixării glicogenului şi conservării elementelor minerale insolubile în alcool; în marea majoritatea a cazurilor este folosit în amestecuri (alcool-formol, amestecul Carnoy etc). Utilizat singur este un fixator mediocru prezentând o serie de inconveniente (ex.retracţia ţesuturilor după un anumit timp de acţiune).

b. *Formaldehida* - este un gaz ce este utilizat sub formă de soluţie în apă cu o concentraţie de 36%-40% fiind în mod obişnuit numită **formol.**

Soluţiile formaldehidei constituie fixatorii cei mai folosiţi, fiind utilizaţi frecvent singuri şi nu în amestecuri. Aceste soluţii trebuie însă neutralizate adăugând carbonat de calciu sau de sodiu sau tamponate până la neutralitate.

În caz contrar, se formează progresiv acid formic prin oxidare, ceea ce reprezintă un inconvenient important pentru fixare. Formolul face parte totodată din numeroase amestecuri fixatoare.

c) *Acizii organici şi minerali* - nu sunt utilizaţi singuri ci ca adjuvanţi în amestecurile fixatoare. Ex: 1) **acidul acetic**, unul din cei mai vechi fixatori cunoscuţi, este utilizat în diferite amestecuri: Bouin, Hollande, Carnory, etc; este un bun fixator al nucleului.
2) **acidul tricloracetic** - în soluţii apoase de 5-10% are proprietăţi asemănătoare, prezentând şi o capacitate decalcifiantă; intră în alcătuirea amestecului Bouin tricloracetic şi a fixatorului Heidenhain denumit "Susa".
3) **acidul picric** - este un excelent fixator al protinelor şi adăugarea lui în soluţiile fixatoare favorizează anumite coloraţii cum ar fi cele ale colagenului sau cele folosite pentru studiul glandelor endocrine.
4) **acidul cromic** - în soluţie apoasă 1% este utilizat exclusiv ca djuvant în anumite amestecuri ex: Flemming, Benda, etc.

d) *Tetraoxidul de osmiu* - este cel mai bun fixator citologic cunoscut, rămânând încă fixatorul de bază pentru studiile de microscopie electronică, deoarece păstrează cel mai bine structurile tisulare şi relaţiile dintre acestea. Prezintă dezavantajul de a fi puţin penetrant şi de a face ţesuturile foarte friabile, făcând dificilă confecţionarea secţiunilor. Pentru aceste motive şi datorită preţului ridicat şi toxicităţii sale (conjuctivite), este puţin utilizat ca fixator în microscopia fotonică.

Este folosit doar pentru conservarea mitrocondriilor sau a aparatului

Golgi sau în stare de vapori pentru fixarea frontiurilor. Alte substanţe folosite ca fixatori chimici simpli sau intrând în compoziţia unor amestecuri fixatoare sunt: sărurile de metale grele (bicromat de potasiu) clorura mercurică, acetonă, dioxanul etc.

2.1.2.2.2. Amestecuri fixatoare

Sunt amestecuri de doi sau mai mulţi fixatori simpli la care se pot adăuga aubstanţe destinate realizării unui anumit pH al soluţiei.

Principalele amestecuri fixatoare utilizate în biologia celulară se pot sistematiza în patru grupe:

1. *Amestecuri cromo-osmice* (Flemming, Benda, Champy, Benoit Nassonov) conservă foarte bine structurile nucleare, centriolii, aparatul fusorial, diferenţieri ale plasmalemei ca marginea în perie, platoul striat şi cilii. Retricţiile sunt mici şi piesele se pot include în parafină. Timpul optim de fixare este de 12-24 ore.

2. *Amestecurile cromice fără OsO_4 şi acid acetic* (Orth, Kopsch, Regaud, Helly, Maximov) sunt utilizate pentru studiul mitrocondriilor şi permit impregnarea argentică a complexului Golgi; conservă granulele de secreţie iar gama de coloraţii şi reacţii citochimice după aceste fixări este foarte largă.

3. *Amestecuri de bază de metale grele în afară de crom şi OsO_4* (Ramon y Cajal, Da Fano, Aoyama) conservă mitrocondiriile şi permit impregnarea argentică a complexului Golgi. Timp optim de fixare 3-25 ore.

4. *Amestecurile cromo-acetice* (Telliensniczky, Zenker, Kolmer, Sanfelice) se folosesc în studiul granulelor de secreţie, a ergastoplasmei, cililor precum şi în cariologie. Timp optim de fixare 12-24 ore.

Alţi fixatori: În afara celor patru grupe descrise mai sus, se pot utiliza cu rezultate asemănătoare şi alţi fixatori.

1. *Amestecul formol-calciu* (Baker) reprezintă un excelent fixator pentru mitocondrii şi complexul Golgi.

2. *Fixatorii Clarke şi Carnoy* conservă foarte bine reticulul endoplasmatic granular.

3. *Fixatorii Bouin, Susa, Heidenhein* sunt utilizaţi în studiul produşilor de secreţie iar amestecurile pe bază de sublimat şi formol sau acid acetic pot servi pentru conservarea centrosomului, aparatului fusorial şi cililor.

2.1.2.3. Practica fixării

Arta fixării constă în utilizarea corectă a fixatorului ce corespunde fiecărui caz în parte, adică de a şti ce fixator trebuie folosit în funcţie de obiectivele lucrării, cunoscut fiind faptul că nu există un fixator universal. Un fixator simplu e greu să întrunească toate calităţile necesare unei bune fixări, motiv pentru care se recurge la amestecuri fixatoare în care diverşi constituienţi îşi completează reciproc acţiunea. La alegerea fixatorului se ţine cont de:

- natura ţesutului sau organului;
- detaliile de structură care trebuie evidenţiate;
- coloraţia pe care o vrem să o facem.

2.1.2.3.1. Reguli generale ale fixării

a. *Evitarea alterărilor autolitice* - fixarea trebuie făcută cât mai repede posibil după recoltarea materialului biologic

b. *Spălarea fragmentelor* - într-o soluţie fiziologică şi nu în apă care poate provoca umflarea ţesuturilor.

c. *Evitarea uscării ţesuturilor* - făcând toate manavrele ce preced fixarea într-un mediu umed (ex. acoperind fragmentele cu o soluţie fiziologică umectând lamele de ras şi celelalte instrumente cu aceeaşi soluţie)

d. *Tăierea unor fragmente suficient de mici*

e. *Facilitarea la maximum a penetrării fixatorului* - în organe şi ţesuturi; pentru aceasta se vor utiliza flacoane mari cu fundul plat şi dop rodat; nu se va lăsa sânge sau mucus la suprafaţa piesei; se evită ca acestea să se lipească de pereţii recipientului în care se face fixarea, agitând din timp în timp flaconul.

f. *Utilizarea unui volum suficient de fixator*

În afara unor cazuri particulare, volumul fixatorului trebuie să fie de aproximativ 40-50 ori mai mare decât a fragmentului fixat.

g. *Piesele se introduc* în amestecul fixator **ambalate în tifon** şi purtând un număr de ordine pentru identificare.

h. *Durata fixării* variază în funcţie de compoziţia amestecului fixator, structura şi dimensiunea pieselor, temperatură - existând o durată optimă pentru fiecare fixare.

i. *Un fixator utilizat odată nu poate fi folosit* pentru fixarea altei piese

Nici un fixator citologic nu este universal şi de aceea arta fixării constă în alegerea corectă a amestecului în raport de ceea ce trebuie studiat.

Scanned with OKEN Scanner

	ORGANIT	FIXATORI UTILIZATI
1.	Nucleul	Clarke, Carnoy, Bouin + CrO_3
2.	Cromatină sexuală	Amestecuri cromo-osmice
3.	Nucleolul	Sanfelice şi fixatori pe bază de CrO_3
4.	Complex Golgi	Champy, Nassonov, R.Y.Cajal, Da Fano
5.	Mitrocondrii	Orth, Kopsch, Regaud, Altman, Benoît
6.	R.E.G.	Bouin, Susa, Heidenhaim, Clarke, Carnoy
7.	Tonofibrile	Carnoy
8.	Microvili	Carnoy, Flemming, Benda, Campy, Benoît
9.	Cili	Sanfelice, Kolmer, Champy, Benda
10.	Granule de secreţie	Bouin, Zenker, Susa, Clarke, Caroy

2.1.2.3.2. Compoziţia chimică a fixatorilor citologici

A. Amestecuri cromo-osmice

1. *Fixatorul Fleimming*
- tetraoxid de osmiu 2% 4 ml
- trioxid de crom 1% 15 ml
- acid acetic 1 ml

2. *Fixatorul Benda*
- tetraoxid de osmiu 2% 4ml
- trioxid de crom 1% 15 ml
- acid acetic 3 pic.

3. *Fixatorul Altman*
- tetraoxid de osmiu 2% 10 ml
- biocromat de K 5% 10 ml

4. *Fixatorul Champy*
- tetraoxid de osmiu 2% 4 ml
- trioxid de crom 1% 7 ml
- biocromat de K 7 ml

5. *Fixatorul Benoît*
- tetraoxid de osmiu 2% 5 ml
- biocromat de K 5% 6 ml
- clorură mercuriană 5% 5 ml

Scanned with OKEN Scanner

- nitrat de uranil 4% 4 ml

B. Amestecuri cromice

1. *Fixatorul Kopsch*
- biocromat de K 3,5% 4 ml
- formol 40% 1 ml

2. *Fixatorul Orth*
- lichid Müller 9 ml
  - apă distilată 100 ml
  - biocromat de K 2,5g
  - sulfat de Na 1g
- formol 40% 1 ml

3. *Fixatorul Regaud*
- biocromat de K 3% 4 ml
- formol 40% 1 ml

4. *Fixatorul Helly*
- lichid Zenker 9,5 ml
  - clorură mercurică 5g
  - apă distilată 100 ml
- formol 40% 0,5 ml

C. Amestecuri pe bază de metale grele în afară de Os şi Cr

1. *Fixatorul R.Y.Cajal*
- nitrat de uranil 2% 85 ml
- formol 40% 15 ml

2. *Fixatorul Da Fano*
- nitrat de cobalt 1% 85 ml
- formol 40% 15 ml

D. Alţi fixatori

1. *Fixatorul Bouin*
- soluţie apoasă saturată de acid picric 75 ml
- acid acetic cristalizat 5 ml
- formol 40% 25 ml

2. Fixatorul Carnoy
- alcool etilic 100% 60 ml
- cloroform 30 ml
- acid acetic 10 ml

Piesele se trec direct în alcool etilic 100%

Scanned with OKEN Scanner

2.1.3. *Includerea în parafină*

Introdusă în tehnica histologică de Krebs încă din 1869, includerea în parafină reprezintă şi astăzi cea mai utilizată din toate tehnicile de includere (celoidină, unele mase plastice, gelatina).

Produsul cunoscut sub numele de parafină este un amestec de hidrocarburi alifatice prezentând o serie de caractere fizice de care depind calitatea includerii şi a secţiunilor: gradul de fisurare ce indică prezenţa între cristale a aerului şi impurităţilor lichide, duritatea, plasticitatea şi vâscozitatea. Din punct de vedere chimic parafina nu este miscibilă nici cu apa nici cu alcoolurile: metilic, etilic şi propilic, nici cu glicerina; este miscibilă cu eterul sulfuric, anilina, dioxanul, sulfura de carbon, hidrocarburile benzenice, etc.

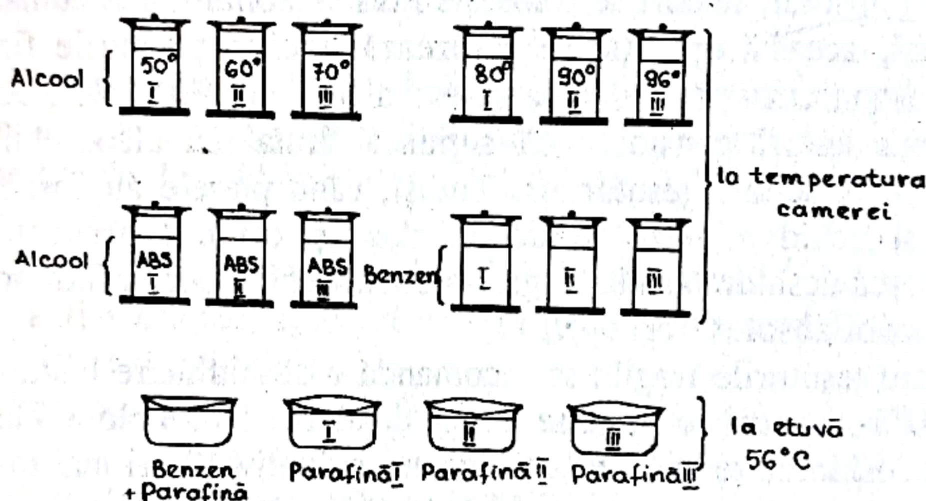


Fig.15. Bateria de includere la parafină

Includerea la parafină este condiţionată de aceste caractere de solubilitate şi o penetrare perfectă a pieselor necesită în primul rând deshidratarea lor şi apoi impregnarea cu un lichid miscibil cu parafina; numai piesele tratate prin criodesicare pot fi impregnate bine cu parafina fără nici o baie complementară. Utilizarea cu succes a parafinei în citologie se datorează tocmai proprietăţilor sale:

1. solubilitatea în agenţi clarifianţi şi topirea la temperaturi apropiate de 55° ce permite impregnarea ţesuturilor fără ca acestea să sufere alterări structurale importante.

2. ea redevine solidă, fără a fi de o duritate excesivă la temperatură

obişnuită, fapt ce permite confecţionarea de "blocuri" în care fragmentul tisular inclus, este perfect menţinut şi va putea fi secţionat la grosimi foarte mici.

Includerea la parafină a ţesuturilor fixate prin una din metodele descrise anterior se realizează parcurgând următoarele etape principale: deshidratarea, clarificarea, impregnarea cu un solvent al parafinei, impregnarea cu parafină urmată de includerea propriu-zisă.

2.1.3.1. Deshidratarea

Deoarece parafina nu este solubilă în apă nu se pot include ţesuturile fixate ce conţin multă apă, fără o prealabilă deshidratare. Aceasta se face cu un agent chimic anhidru capabil să absoarbă apa din ţesuturi în condiţiile în care acestea nu modifică structurile celulare. În practică, cel mai des utilizat este alcoolul absolut; uneori se foloseşte însă diaxonul sau acetona.

Uzual, această operaţie se realizează trecând ţesuturile fixate prin alcooluri de concentraţie crescătoare, ex: alcool 60^0, 70^0, 80^0, 95^0, 100^0, deoarece unii autori consideră că acţiunea brutală a alcoolului absolut antrenează o retracţie a ţesuturilor. Totuşi, când piesele au fost fixate cu ajutorul unui lichid pe bază de alcool, chiar şi cei mai prudenţi citologi admit începerea deshidratării la un grad alcoolmetric superior fixatorului (96^0 sau chiar alcool absolut-Carnoy).

Pentru ţesuturile fragile se recomandă o deshidratare lentă începând cu alcool 50^0 iar pentru celelalte se începe cu alcool 70^0. Volumul alcoolului din baia de deshidratare trebuie să fie de aproximativ 10 ori mai mare decât volumul piesei.

Este preferabilă utilizarea mai multor băi de scurtă durată decât o singură baie abundentă şi prelungită.

Durata deshidratării este în funcţie de volumul fragmentelor tisulare. Pentru cele de talie mijlocie deshidratarea se efectuează în 2-3 ore.

Deshidratarea trebuie să se încheie întotdeauna, în cazul în care se face în etanol, cu o baie de alcool absolut nou, ce nu a fost folosit.

2.1.3.2. Clarificarea

Se face după deshidratare, piesa fiind trecută prin băi succesive de solvent organic. Acesta poate fi: toluen, xilen, benzen, cloroform.

Clarificarea se face în general în 3 băi de 1-6 ore pentru piesele mijlocii şi de 15-30 min. pentru un fragment biopsic sau o piesă foarte mică.

2.1.3.3. Impregnarea cu parafină

Se face în parafină menţinută în stare lichidă, prin plasarea ei într-un termostat la 56^0. Se adaugă la parafină o mică cantitate (5-10%) de ceară de albine care îmbunătăţeşte consistenţa blocului şi va permite o bună secţionare. Calitatea secţiunilor depinde în mare parte şi de absenţa oricărei urme de solvent în parafină; aceasta se obţine prin trecerea pieselor prin cel puţin 3 băi succesive de parafină înaintea turnării blocului. Durata impregnării variază în funcţie de volumul piesei, fiind în medie de 6 ore.

Unii autori au imaginat sisteme de impregnare sub vid, camera termostatului fiind branşată la o pompă de vid. Acest procedeu permite o impregnare mai rapidă şi este, în special, foarte bună pentru impregnarea ţesuturilor aerate, cum ar fi fragmentele pulmonare.

2.1.3.4. Includerea propriu-zisă

După ieşirea din ultima baie de parafină, piesa se aşează în parafină nouă, neutilizată, care se toarnă într-o formă, în general alcătuită din bare metalice-barele Leuckhardt - (se pot utiliza şi bare realizate din carton, aluminiu sau plastic.

Răcirea acestei parafine duce la solodificarea ei şi obţinerea unui bloc gata de a fi secţionat. Răcirea este în general obţinută lăsând parafina la temperatura laboratorului.

Pentru identificarea diferitelor piese dintr-un bloc ne servim în continuare de aceleaşi cartonaşe cu numere de ordine care le-au însoţit pe parcursul prelucrării lor, inclusiv în băile de parafină.

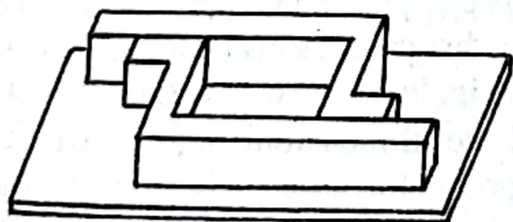


Fig.16. Barele Leuckart

Parafina este mediul de includere cel mai frecvent utilizat dar, există şi alte medii şi tehnici de includere: în paraplast, în celoidină, dublă includere în celoidină şi parafină, în dietilen sau polietilen glicol sau în gelatină, unele dintre ele fiind introduse destul de recent în practica citologică şi vor căpăta probabil o mare dezvoltare în viitor.

Scanned with OKEN Scanner

1. *Includerea în paraplast*

Paraplastul este un amestec de parafină purificată şi polimeri plastici care prezintă o mare rezistenţă şi elasticitate. Includerea pieselor în acest amestec permite confecţionarea de secţiuni deosebit de fine de ţesuturi dure sau de consistenţă diferită cu rezultate foaret bune; în acest domeniu, acestă metodă tinde să înlocuiască tot mai mult procedeele clasice de includere în celoidină sau de dublă includere. Anumite laboartoare utilizează în mod curent paraplastul în locul parafinei. Tehnica de includere este aceeaşi ca şi în cazul includerii în parafină.

2. *Includerea în celoidină*

Celoidina, utilizată în soluţie cu un amestec de eter şi etanol, este un mediu de includere care are avantajul de a realiza impregnarea ţesuturilor la rece. Ea este o formă purificată de nitroceluloză.

Includerea pieselor este foarte simplă: după fixare ele sunt deshidratate apoi impregnate cu soluţii de celoidină în concentraţie crescătoare, la temperatura laboratorului; când este gata impregnarea se lasă să se întărească ultima soluţie prin evaporarea solventului şi blocul astfel obţinut este gata pentru secţionat. Acest procedu de includere prezintă faţă de includerea în prafină avantaje şi dezavantaje.

Dintre avantaje amintim faptul că:

- tehnica este simplă şi principiul său nu necesită încălzirea;
- mediul de includere conservă bine structurile şi raporturile între ţesuturi de consistenţă diferită;
- consistenţa sa fermă şi elastică este un excelent suport pentru ţesuturile dure;

Aceste proprietăţi fac din celoidină mediul de includere ideal pentru organele formate din ţesuturi de consistenţă diferită, pentru formaţiuni chistice, ţesuturi fibroase sau musculare din care este adesea dificil de o obţinut secţiuni regulate şi omogene după includerea în parafină.

Consistenţa sa permite secţiuni de dimensiuni mai mari; acest procedeu este folosit pentru includerea organelor cum ar fi: uterul, glanda mamară, etc. şi mai ales encefalul, includerea în celoidină reprezentând metoda de bază în tehnica neurologică.

Dintre inconveniente amintim:

- metoda este lentă şi unele etape mai dificile;
- mediul de includere nu permite confecţionarea unor secţiuni foarte fine (sub 10 microni);
- blocurile nu pot fi conservate ca atare: este necesară păstrarea lor

în etanol 70% sau 80%.

3. *Dubla includere în celoidină şi parafină*

Această metodă combină unele dintre avantajele metodei includerii în celoidină cu cele ale includerii în parafină (rapiditate, obţinerea de secţiuni fine, etc.)

Există mai multe moduri de realizare a acestei metode, cele mai simple constând în: deshidratarea şi impregnarea în soluţii de celoidină în concentraţie crescătoare şi apoi printr-o soluţie (ex: benzen) de clarificare, luând impregnarea piesei cu parafină ca în procedeul uzual al includerii în parafină.

4. *Includerea în dietilen şi polietilen glicol*

a. Dietilen glicolul "Ester Waxes" - mediu mult mai dur decât parafina, prezintă unele avantaje faţă de parafină şi celoidină; blocurile rezultate sunt mai dure decât cele de parafină şi este necesară utilizarea unui cuţit foarte rezistent şi a unui microtom foarte stabil.

b. Polietilen glicolii "Poliester Waxes" - sunt medii de includere care prezintă un mare interes teoretic pentru faptul că sunt hidrosolubili, nefiind necesară deshidratarea pieselor şi folosirea unui agent clarifiant, în felul acesta economisindu-se timp (o includere se poate face în 4-5 ore) şi realizându-se o diminuare a retracţiei ţesuturilor.

Piesele nefiind trecute prin alcooli sau solvenţi organici, lipidele sunt conservate în secţiunile care sunt mai fine şi mai regulate decât cele obţinute prin congelare.

Din păcate, în ciuda optimismului numeroşilor cercetători, secţiunile sunt destul de dificil de realizat şi de etalat pe lamă din cauza higroscopiei polietilen glicolului. Astfel, acestă metodă de includere este folosită doar pentru anumite cercetări cum ar fi studiul lipidelor sau punerea în evidenţă a lipidelor şi a mucopolizaharidelor.

5. *Includerea în gelatină* - este utilizată în cazul unor ţesuturi fragile sau de volum mic.

Fragmentele fixate sunt trecute prin soluţii de gelatină de concentraţie crescătoare, aşezate apoi în gelatină turnată într-o formă, blocul de gelatină se solidifică şi este gata de a fi secţionat.

Procedeul prezintă un inconvenient: gelatina solidificată prin acţiunea formolului nu poate fi prea mult îndepărtată ceea ce crează dezavantaje la colorarea secţiunilor.

Scanned with OKEN Scanner

6. *Includerile automate*

Intreprinderi specializate furnizează de câţva ani aparate ce permit trecerea automată a pieselor prin diferiţi agenţi chimici utilizaţi pentru includere. Aceste aparate au cunoscut un mare succes şi echipează în prezent multe laboratoare.

Ele prezintă un avantaj: economisirea timpului deoarece aparatele funcţionează continuu, zi şi noapte şi sunt înzestrate cu sisteme de agitare a pieselor în diferiţi solvenţi, ceea ce creşte viteza de impregnare.

Dau rezultate bune când sunt folosite la includerea fragmentelor de volum asemănător, timpii de trecere a pieselor prin diferite băi fiind în funcţie de acest volum.

2.1.4. *Secţionarea*

Confecţionarea secţiunilor pare la prima vedere cea mai simplă manoperă din cadrul celor care duc în final la realizarea unui preparat citologic.

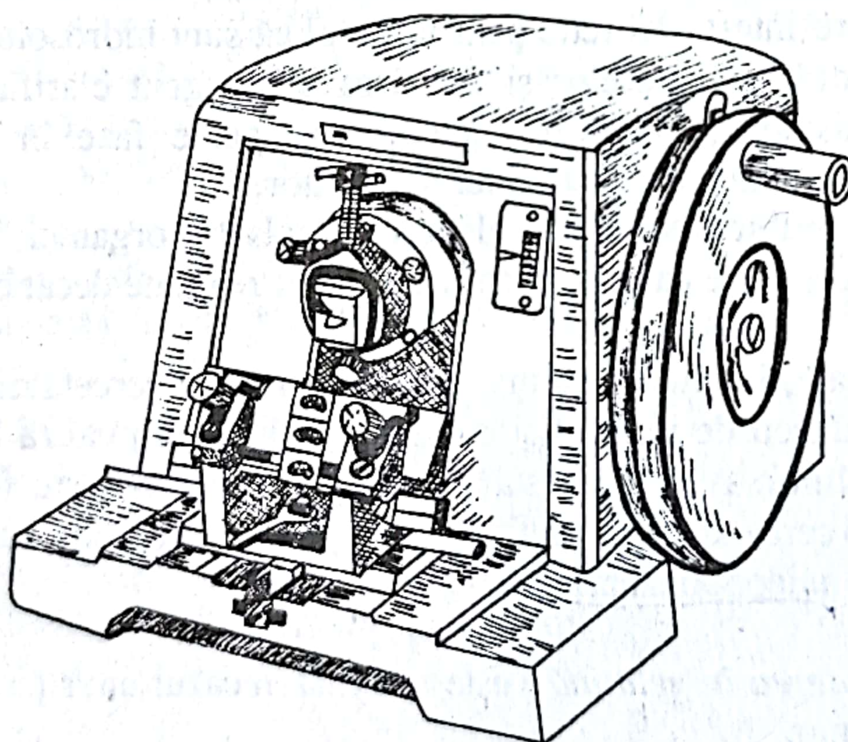


Fig.17. Microtomul de parafină Spencer 820

Realitatea este însă cu totul alta. Obţinerea unor secţiuni bune nu este un lucru chiar atât de uşor, fiind posibilă numai după o experienţă

îndelungată. Modul în care sunt realizate secţiunile, influenţează calităţile optice ale preparatelor finale la fel de mult ca şi fixarea.

Secţionarea se realizează cu ajutorul microtoamelor, existând două tipuri.

1. Microtoame cu mişcare verticală, piesa deplasându-se de sus în jos, secţionarea fiind realizată de un cuţit cu tăişul înalt (ex: microtomul rotativ Spencer 820, Minot etc.)

2. Microtoame cu mişcare orizontală: în acest caz piesa poate fi menţinută fix, cuţitul deplasându-se orizontal, sau invers cuţit fix şi piesa în mişcare.

Primul tip de microtom este cel mai utilizat, fiind folosit pentru secţionarea blocurilor de parafină.

Al doilea tip este folosit mai ales pentru blocurile de celoidină, pentru cele care au suferit o dublă includere sau pentru blocurile mari de parafină.

Piesele esenţiale ale unui microtom tip rotativ sunt: cuţitul, suportul cuţitului care-l menţine în poziţie şi permite orientarea lui, port-obiectul şi dispozitivul lui de fixare, şurubul micrometric cu ajutorul căruia se fixează grosimea secţiunii, dispozitivul pentru avansarea piesei şi roata motrice.

Înaintea secţionării propriu-zise, blocul de parafină ce conţine preparatul se va modela în formă de trunchi de piramidă patru unghiulară astfel încât în jurul piesei să rămână o bandă de parafină de 1-2 mm grosime. Astfel finisat el se fixează, indiferent de mediul de includere folosit, cu baza mare pe un port-obiect care se montează la microtom.

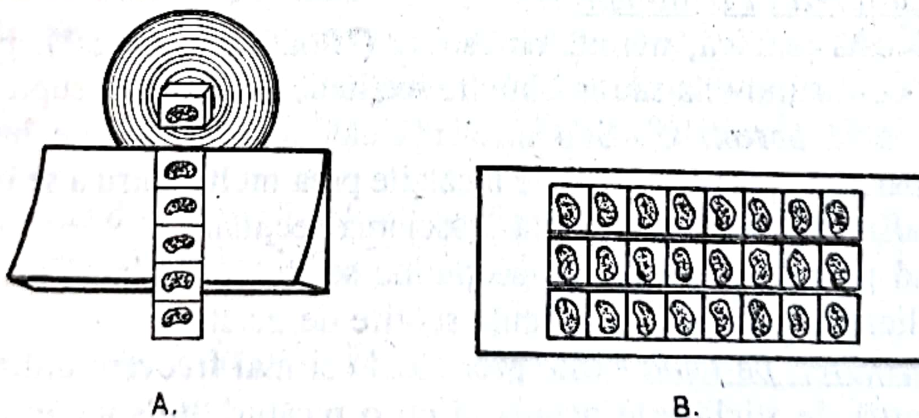


Fig.18. Banda de secţiuni seriate. a-secţiunile la parafină; b-etalate pe lama port-obiect

Pentru blocurile de parafină această operaţie este foarte simplă: se

Scanned with OKEN Scanner

încălzeşte port-obiectul metalic apoi se aplică blocul de parafină, se introduc poi în apă rece, menţinând în contact cele două piese până când blocul aderă solid la port-obiect.

Montarea blocurilor de paraplast, Ester Wax, sau a celor obţinute prin dublă includere se realizează la fel ca şi în cazul blocului de parafină.

Blocurile de celoidină şi Necol sunt montate pe port-obiecte din lemn sau plastic pe care se pune un strat dintr-o soluţie de celoidină 2% în alcool-eter; blocul este menţinut apoi apăsat pe portobiect timp de o oră şi ansamblul este apoi introdus în alcool 70% timp de o jumătate de oră, înainte de a fi fixat la microtom.

2.1.5. *Etalarea şi lipirea secţiunilor pe lamă*

În vederea prelucrării lor ulterioare (colorare), secţiunile trebuie aplicate pe un port-obiect (lamă de sticlă cu dimensiunile de 76/26 mm şi grosimea de 1-1,5 mm) bine degresat.

Metodele de etalere şi lipire varaiză în funcţie de procedeul de includere ce a fost folosit:

1. *Pentru secţiunile la parafină*, paraplast sau Ester Wax: panglicile de parafină obţinute prin procedeul secţionării la microtom sunt plisate şi trebuie etalate pe un mediu lichid, slab încălzit, pentru ca pliurile să dispară. Pentru aceasta se pot utiliza două procedee:

a. *Etalarea la bain-marie*:

În acestă tehnică, numită de flotare ("floating technics"), panglicile de parafină conţinând una sau mai multe secţiuni, sunt puse la suprafaţa apei la bain-marie la aprox.40^0. Sub influenţa căldurii parafina se înmoaie şi pliurile dispar. Panglicile nu trebuie încălzite prea mult pentru a se împiedica topirea parafinei ceea ce ar duce la disocierea secţiunii.

Când pliurile au dispărut, secţiunile se trec pe o lamă de sticlă pe care s-a aplicat în prealabil o peliculă subţire de gelatină.

b. *Etalarea pe lamă* - este procedeul cel mai frecvent utilizat.

O lamă de sticlă este acoperită cu o picătură de soluţie apoasă de gelatină (0,1-0,2%) sau albumină Mayer (50g albuş de ou, 50g glicerină şi 1g salacilat de sodiu dizolvat în puţină apă distilată, amestec care se va filtra sub un clopot) - cel mai des utilizat sau soluţie de amidon sau amilopectină, plasmă umană sau soluţii agar care se întind bine cu ajutorul pulpei auricularului. Din panglica de parafină se taie fragmente conţinând 3-4

Scanned with OKEN Scanner

secţiuni care se aplică (cu faţa lucioasă în jos) pe suprafaţa unsă cu albumină Mayer a lamei; se picură apă distilată la una din extremităţile panglicii de parafină şi înclinăm puţin lama pentru ca secţiunile să plutească; o aşezăm orizontal pe o placă încălzitoare reglată la o temperatură inferioară celei a punctului de topire al parafinei folosită pentru includere.

În câteva secunde secţiunile se descreţesc şi se întind complet (la nevoie pentru întinderea completă a secţiunilor se pot folosi două ace de disociere).



Fig.19. Suportul pentru uscarea preparatelor

După întinderea completă, apa în exces se îndepărtează iar lamele puse înclinat pe un stativ de lemn se introduc într-un termostat la 37°C unde, timp de 24 ore se desăvârşeşte uscarea şi lipirea secţiunilor. Ferite de praf, aceste preparate pot fi conservate necolorate timp îndelungat.

2. *Pentru secţiunile în celoidină* - pot fi utilizate trei modalităţi de etalare şi lipire:

a. Transportul secţiunilor culese în etanol 70%, în diferiţi reactivi sau coloranţi: pelicula de celoidină menţine textura secţiunii astfel încât aceasta nu suferă alterări în cursul manoperelor; secţiunea va fi apoi montată pe o lamă fără eliminarea peliculei de celoidină.

b. Se poate deasemenea lipi secţiunea pe o lamă de sticlă cu ajutorul unei soluţii de celoidină; procedeul nu poate fi aplicat decât în cazul când coloraţiile ulterioare nu colorează celoidină care nu este eliminată înaintea montării.

c. Când coloranţii folosiţi se fixează pe celoidină secţiunile trebuie lipite cu ajutorul unei soluţii de gelatină.

3. *Secţiunile în celoidină-parafină* sunt în general etalate şi lipite ca şi secţiunile la parafină.

4. *Secţiunile în polietilen-glicol*

Secţiunile vor fi etalate folosind o soluţie de gelatină sau albumină, dar la rece. Etalarea corectă este adesea dificil de obţinut datorită higroscopiei polietilen-glicolilor folosiţi, dar utilizarea mediului Reid şi Sarantakos îndepărtează acest inconvenient.

2.2. METODA SECŢIONĂRII LA GHEAŢĂ ŞI CRIOTOM

Cu ajutorul microtomului de congelare şi a criotomului se pot obţine preparate permanente sau temporare făcându-se secţiuni de ţesut proaspăt nefixat sau secţiuni de ţesut fixat.

A. *Secţiuni de ţesut proaspăt, nefixat se fac în următoarele situaţii:*

1. când se cere un diagnostic anotomo-patologic urgent (examen extemporaneu, timp de execuţie 15-30 min); de acest diagnostic depinde tehnica operatorie;
2. detectarea histochimică a unor substanţe (grăsimi) care sunt solubile în hidrocarburile benzenice utilizate în tehnica includerii la parafină.
3. în unele cercetări histoenzimologice.

B. *Secţiunile de ţesut fixat* au indicaţii numeroase dintre care mai importante sunt:

1. examenul extemporaneu făcut pe fragmente de ţesut sau organ introduse rapid în formol cald; procedeul este brutal dar oferă rezultate mulţumitoare.
2. unele studii histochimice (catecolamine, vitamina D, etc.).
3. cercetări neurohistologice (metoda Benda-Spielmayer pentru mielină, Bielschowsky - Gross pentru terminaţii nervoase).

ATENŢIE: Secţiunile din piesele fixate în fixatori apoşi trebuie bine spălate iar cele din fixatorii anhidri, hidrate.

2.2.1. *Tehnica secţionării la microtomul de congelare*

Microtromul de congelare funcţionează pe acelaşi principiu general ca şi cel de parafină cu deosebirea că portobiectul este fix iar cuţitul este mobil; deasemenea, portobiectul prevăzut cu orificii la bază, este racordat printr-o canductă capilară la o butelie metalică în care se găseşte anhidridă carbonică lichidă sub presiune (fig.20).

Pe portobiectul microtromului se aplică o rondelă de hârtie de filtru îmbibată cu apă.

Piesele fasonate din ţesutul sau organul proaspăt, nefixat sau fixat, se aşează pe rondele de hârtie de filtru umezită. Se vor confecţiona piese cu o grosime de 0,5-0,8 cm cu feţele plane şi paralele.

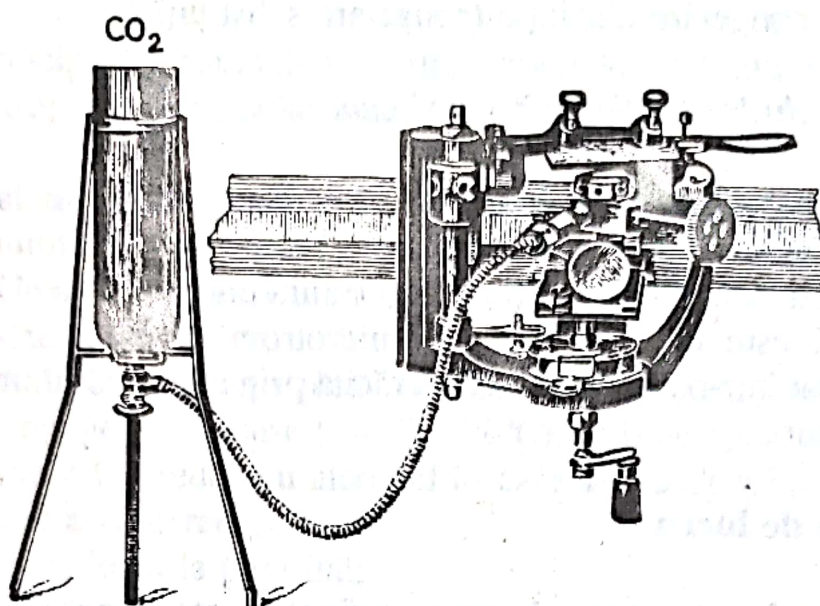


Fig.20. Microtromul pentru secţionarea pieselor congelate (model Leitz).

Se acoperă piesa şi portobiectul cu un pahar de sticlă sau plastic transparent, se deschide cu intermitenţă robinetul buteliei şi prin detenta vaporilor de anhidră carbonică se produce îngheţarea şi aderarea piesei de portobiect.

Prin intermediul şurubului micrometric se ridică portobiectul până când piesa ajunge aproape de cuţitul microtromului care are o poziţie orizontală. După fixarea grosimii, prin mişcări rapide şi complete ale suportului cu cuţit, se obţin secţiuni de 10-15 microni; acestea se culeg cu pulpa degetului sau cu o pensulă umedă printr-o mişcare de la bază spre tăişul cuţitului şi se pun într-un cristalizator cu apă distilată unde se dezgheaţă şi se întind.

Lipirea secţiunilor. Lamele portobiect după ce au fost acoperite cu un strat subţire de albumină Mayer se lasă să se usuce 15-30 min la temperatura camerei. Se inroduc apoi oblic în vasul cu apă distilată şi cu ajutorul unei baghete de sticlă în formă de *L* secţiunile se pescuiesc pe lame.

Se elimină excesul de apă prin presare uşoară cu o hârtie de filtru şi se colorează rapid.

DE REŢINUT - La ora actuală tehnica secţionării la gheaţă se foloseşte doar pentru lucrări de rutină. Pentru cercetările citologice de fineţe

se utilizează tehnicile de secţionare la criotom, criodesicare (congelare-deshidratare) şi congelare disoluţie (congelare substituţie).

2.2.2. *Tehnica secţionării la criotom*

Acestă metodă se deosebeşte de precedenta doar prin faptul că la acest apart secţionarea nu este influenţată de temperatura mediului ambiant iar cuţitul şi piesa sunt meţinute la o temperatură constantă de -12^{0}C -30^{0}C.

Aparatul este compus dintr-un microtrom asemănător cu cel de parafină amplasat într-o incintă izotermă răcită prin intermediul unui agregat frigorific cu freon.

Tehnica de lucru

Fragmentul de ţesut sau de organ nefixat aşezat pe o rondea de hârte de filtru bine umezită este plasat pe portobiectul criotomului.

- portobiectul cu piesa aşezată vertical pe un suport metalic, sunt introduse într-un recipient special care conţine un lichid refrigerent (azot lichid-temperatura -196^{0}C);
- introducerea portobiectului cu piesa congelată în suportul criotomului aflat în camera izotermă şi secţionarea la grosimi de 5-10 microni;
- secţiunile care rămân întinse pe cuţit se aplică pe lame portobiect prin simplu contact.

Indicaţiile criotomiei

- cercetări de citochimie
- studii de citoenzimologie
- cercetări de imunofluorescenţă.

2.2.3. *Metoda criodesicării* (congelare-deshidratare)

Principiul acestei metode precum şi timpii ei au fost descrişi la capitolul II. Metoda este folosită în studiul citologic de fineţe şi citoenzimologic. În histochimie, metoda este utilizată numai în studiul catecolaminelor.

2.2.4. *Metoda de congelare-substituţie*

Principiul acestei tehnici este apropiat de cel al metodei de congelare-deshidratare; conservarea substanţelor din celule este bună.

Tehnica de lucru

- Congelarea bruscă a unui fragment de ţesut sau organ proaspăt în azot lichid;
- Substituţia gheţii prin transferul piesei congelate în alcool etilic absolut la temperaturi joase (-40^{0}C - 70^{0}C) timp de aproximativ 7 zile;
- Piesa împreună cu alcoolul în care s-a făcut substituţia va fi adusă la temperatura camerei;
- Includerea la parafină;
- Secţionarea;
- Colorarea

Indicaţii

Prin acestă metodă se conservă foarte bine structurile citologice şi numeroşi componenţi chimici. Substituţia în acetonă a permis evidenţierea a numeroase activităţi enzimatice ca: fosfataza alcalină şi acidă, succindehidrogeneza, adenozintrifosfataza etc.

Se conservă foarte bine acizii nucleici şi glicogenul.

2.2.5. *Tehnica colorării secţiunilor obţinute la microtromul de congelare*

Colorarea secţiunilor la congelare se poate face fie pe secţiuni libere fie pe secţiuni lipite pe lame portobiect.

În primul caz, bateria de colorare este formată din cutii Petri cu diametru mic prin care secţiunile se trec cu ajutorul unor baghete de sticlă în formă de "L". După colorare, aceste secţiuni se pescuiesc pe lame portobiect şi se montează în medii apoase.

În al doilea caz, secţiunile se colorează la fel ca cele la parafină.

Colorarea secţiunilor lipite pe lame cu soluţiea 1% de albastru tuluidină are următorii timpi:

- trecerea secţiunilor prin alcool etilic 90%, 1-2 secunde şi apoi în

alcool etilic 100% timp 1-2 secunde;

- introducerea lor într-o baie de xilol timp de aporximativ 2 secunde;
- îndepărtarea xilolului prin alcool etilic 100%, 1-2 secunde şi alcool etilic 90%, 1-2 secunde;
- lamele cu secţiunea în sus se aşează pe un suport orizontal şi se acoperă cu soluţia de albastru de toluidină 30-60 secunde;
- spălarea rapidă în apă distilată-sugativare;
- deshidratare rapidă în alcool etilic 90% - sugativare, apoi în alcool etilic 100% - sugativare;
- clarificare în xilol, montare în balsam de Canada.

Rezultate

Nucleii apar în albastru închis iar citoplasma în albastru deschis.

2.3. METODA ETALĂRII MATERIALULUI BIOLOGIC ÎN MONOSTRAT

Acestă metodă cuprinde tehnica frotiului şi amprentelor de organe. Prin tehnica frotiului, se realizează întinderea celulelor în monostrat pe lame de sticlă, putând fi examinate celulele sanguine (periferice şi medulare) celulele epiteliale descuamate sau exfoliate (din piele, cavitate bucală, faringe, căi respiratorii extra şi intrapulmonare, vagin, col uterin, endometru, căi galactofore, lichid cefalo-rahidian, lichid pleural, lichid de ascită), amprente de organe.

Metoda este mult utilizată în citologie, devenind prioritară atât în domeniul cercetării biologice cât şi ca procedeu de diagnostic în practica medicală.

2.3.1. *Tehnica frotiului de sânge*

Executarea unui frotiu de sânge constituie o tehnică de bază a microscopiei clinice, căci după principiile executării sale se execută şi frotiurile de măduvă oasoasă, suc gastric, sedimente de lichide seroase etc.

Un preparat hematologic sau citologic este inutilizabil dacă este realizat cu o tehnică necorespunzătoare care distruge morfologia elementelor celulare. Numai un frotiu corect executat permite o interpretare microscopică corespunzătoare, utilă diagnosticului sau cercetării biologice.

Lamele pe care se execută frotiul trebuie să fie perfect curăţate şi

degresate, altfel nu se obţin preparate bune.

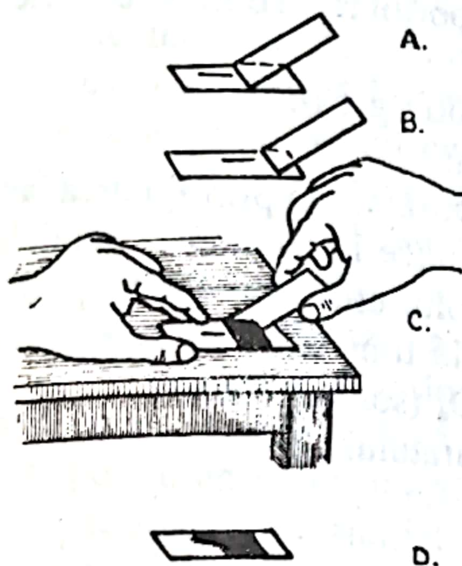


Fig.21. Diferitele etape ale realizării frotiului de sânge

a. *Prelevarea sângelui* - se face la adult prin puncţionarea părţii laterale a pulpei degetului inelar sau medius, iar la nou născut şi sugar din lobul urechii, partea laterală a halucelui sau din călcâi. Locul puncţionării se dezinfectează şi se degresează cu ajutorul unui tampon îmbibat în alcool sau eter.

Se prinde degetul subiectului cu mâna stângă, fixându-l între index şi police şi printr-o mişcare rapidă se puncţionează locul dezinfectat cu un ac pentru injecţii subcutanate, sterilizat.

Primele două picături se şterg cu ajutorul unei comprese uscate deoarece conţin prea mult lichid interstiţial sau impurităţi de pe piele.

b. *Efectuarea frotiului propriu-zis* - constă în întinderea pe o lamă portobiect curată a unei picături de sânge într-un strat subţire şi uniform.

Picătura de sânge care apare pe pulpa degetului se ridică cu marginea mică a unei lame şlefuite şi se aplică pe una din extremităţile unei lame portobiect aşezate orizontal.

În momentul contactului cu lama portobiect, se imprimă lamei pe care se află picătura de sânge o mişcare de lateralitate pentru ca sângele să se întindă pe toată linia de contact după care se imprimă lamei şlefuite o mişcare de translaţie în lungul lamei portobiect.

Frotiul este bine executat dacă are:

- două mărgini laterale şi se termină în franjuri;
- o grosime potrivită: elementele figurate să nu fie suprapuse şi totodată suficient de dese.

Grosimea frotiului de sânge depinde de:

1. mărimea picăturii de sânge (picătură mică, frotiu subţire);
2. unghiul dintre lama şlefuită şi lama portobiect ce trebuie să fie de 30^0-35^0 (frotiu subţire);
3. viteza de întindere (viteză mare - frotiu gros).

c. *Fixarea frotiului* - se poate face prin:

- **uscare** -sau desicare la temperatura laboratorului prin agitarea lamei pentru a obţine o uscare rapidă; uscarea lentă duce la ratatinarea celulelor;
- **soluţii fixatoare** - frotiu umed; alcoolul etilic absolut timp de 15 min., alcool etilic absolut şi eter în părţi egale timp de 5-15 min., alcool metilic timp de 2 min. sau prin vapori de OsO_4 (soluţie 2%).

După fixare se execută colorarea preparatului.

2.3.2. *Colorarea frotiului de sânge*

Frotiul trebuie colorat cât mai curând după realizarea lui (imediat după întinderea lui sau în primele 24 ore) întrucât pe lamele necolorate celulele se alterează pierzându-şi afinitatea tinctorială.

Actualmente se foloseşte colorarea dublă cu soluţie May-Grümwald-Giemsa ce dă indicaţii asupra compoziţiei chimice a substanţei vii celulare.

Compoziţia colorantului utilizat:

a. *soluţia May-Grümwakd*

+ eozinat de albastru de metilen	1 g.
+ glicerina neutră p.a.	50 ml.
+ alcool metilic p.a.	100 ml.

b. *soluţie Giemsa*

+ eozinat de azur metilen	3 g.
+ azur de metilen	0,8 g.
+ glicerină neutră	250 ml.
+ alcool metilic p.a.	200 ml.

Tehnica colorării

Reactivi şi materiale necesare:

- soluţie May-Grümwald;
- soluţie Giemsa;
- apă distilată neutră;
- pipete Pasteur, pipete gradate;

PH-ul apei distilate trebuie să fie 7 sau 7,2. Apa distilată este de obicei acidă. neutralizarea ei se obţine adăugând câteva picături dintr-o

Scanned with OKEN Scanner

Grosimea frotiului de sânge depinde de:

1. mărimea picăturii de sânge (picătură mică, frotiu subţire);

2. unghiul dintre lama şlefuită şi lama portobiect ce trebuie să fie de 30^0-35^0 (frotiu subţire);

3. viteza de întindere (viteză mare - frotiu gros).

c. *Fixarea frotiului* - se poate face prin:

- **uscare** -sau desicare la temperatura laboratorului prin agitarea lamei pentru a obţine o uscare rapidă; uscarea lentă duce la ratatinarea celulelor;

- **soluţii fixatoare** - frotiu umed; alcoolul etilic absolut timp de 15 min., alcool etilic absolut şi eter în părţi egale timp de 5-15 min., alcool metilic timp de 2 min. sau prin vapori de OsO_4 (soluţie 2%).

După fixare se execută colorarea preparatului.

2.3.2. ***Colorarea frotiului de sânge***

Frotiul trebuie colorat cât mai curând după realizarea lui (imediat după întinderea lui sau în primele 24 ore) întrucât pe lamele necolorate celulele se alterează pierzându-şi afinitatea tinctorială.

Actualmente se foloseşte colorarea dublă cu soluţie May-Grümwald-Giemsa ce dă indicaţii asupra compoziţiei chimice a substanţei vii celulare.

Compoziţia colorantului utilizat:

a. *soluţia May-Grümwakd*

+ eozinat de albastru de metilen	1 g.
+ glicerina neutră p.a.	50 ml.
+ alcool metilic p.a.	100 ml.

b. *soluţie Giemsa*

+ eozinat de azur metilen	3 g.
+ azur de metilen	0,8 g.
+ glicerină neutră	250 ml.
+ alcool metilic p.a.	200 ml.

Tehnica colorării

Reactivi şi materiale necesare:

- soluţie May-Grümwald;
- soluţie Giemsa;
- apă distilată neutră;
- pipete Pasteur, pipete gradate;

PH-ul apei distilate trebuie să fie 7 sau 7,2. Apa distilată este de obicei acidă. neutralizarea ei se obţine adăugând câteva picături dintr-o

soluţie slab alcalină de carbonat de sodiu 1% la 500 ml apă distilată, încercându-se pH-ul cu un indicator universal de hârtie; pH-ul apei se mai controlează şi prin adaos de câteva cristale de hematoxilină (colorarea apei în roz este indicaţia de neutralitate - hematoxilina este violet-albastră în mediu alcalin şi galbenă în mediu acid);

- se acoperă frotiul cu soluţie May-Grümwald şi se lasă 2-3 min. (timp în care soluţia realizează o fixare a frotiului);
- se adaugă apoi peste soluţia May-Grümwald un număr egal de picături de apă tamponată, se omogenizează şi se lasă 2 min. (diluată, soluţia May-Grümwald acţionează ca un colorant);
- se îndepărtează colorantul fără spălare şi se acoperă cu soluţie Giemsa diluată cu apă distilată tamponată în proporţie 1/1 (1 picătură soluţie Giemsa pentru un mililitru apă); se lasă 15-20 min.
- se spală lama sub jet de apă;
- sugativare uşoară;
- se aşează în stativ pentru uscare;

Colorarea pentru trombocite se face la fel, prelungind doar timpul de colorare cu Giemsa la 45 min. iar spălarea lamei nu se face sub jet puternic de apă fiindcă apa antrenează trombocitele.

Clasa unui element sau gradul lui de maturare se stabilesc pe baza unor criterii ce privesc bazofilia citoplasmei elementelor tinere, afinitatea tinctorială a granulaţiilor granulocitelor şi acidofilia eritrocitelor mature.

Acestă metodă de colorare dă indicaţii asupra pH-ului componentelor celulare. Astfel, coloranţii acizi sunt fixaţi de porţiunile alcaline ale celulei, care sunt acidofile, iar coloranţii bazici sunt fixaţi de părţile acide, care sunt bazofile. De exemplu eozina, colorant acid, este fixată de granulaţiile eozinofile ce sunt alcaline (pH=11); albastru de metilen, colorant bazic, este fixat de acidul ribonucleic din citoplasma eritroblastului bazofil colorând-l în albastru; azurul de metilen fixează acidul dezoxiribonucleic din nucleul eritroblastului bazofil. Nucleolul fixează albastru de metilen deoarece conţine acid ribonucleic de tip citoplasmic.

Cu cât o celulă este mai tânără cu atât citoplasma ei este bazofilă, dat fiind concentraţia mare de acid ribonucleic. Pe măsura măturării celula devine tot mai acidofilă deoarece scade concentraţia în acid ribonucleic (ex: evoluţia eritroblaştilor).

Termenii de eozinofil, bazofil, acidofil, indică afinitatea faţă de coloranţii acizi.

Examinarea frotiului de sânge colorat, la microscopul fotonic se începe cu obiectivul de 10 pentru verificarea calităţii tehnice a frotiului.

Apoi se pune la punct cu obiectivul cu imersie şi se examinează pe rând:

- morfologia eritrocitelor;
- frecvenţa şi morfologia trombocitelor;
- frecvenţa şi morfologia leucocitelor, eventual cu întocmirea formulei leucocitare (exprimarea procentuală a diferitelor forme de leucocite).

Pentru întocmirea formulei leucocitare, se examinează frotiul de sânge pe margine, lama deplasându-se într-o singură direcţie, notându-se fiecare tip de leucocit din 100 de leucocite numărate.

Formula leucocitară normală

Granulocite neutrofile nesegmentate	NN = 1-4%
Granulocite neutrofile segmentate	NS = 50-70%
Granulocite eozinofile	E = 1-4%
Granulocite bazofile	B = 0-1%
Limfocite	L = 30-45%
Monocite	M = 4-8%

Pentru a creşte gradul de credibilitate a unei formule leucocitare se examinează 200-400 de elemente şi apoi se face procentajul fiecărei clase de elemente.

Cifra absolută reprezintă numărul fiecăruia dintre elemente pe mm^3 precum şi variaţiile reale.

Cifre absolute normale

- neutrofile nesegmentate	50-320/mm^3
- neutrofile segmentate	3000-4500/mm^3
- eozinofile	100-200/mm^3
- bazofile	20-10/mm^3
- limfocite	1250-2400/mm^3
- monocite	240-480/mm^3

Scanned with OKEN Scanner

Variaţiile formulei leucocitare şi ale numărului de leucocite în funcţie de vârstă (după J.Bernard)

Număr/mm³	Nou-născut	9 luni	3 ani	10 ani	Adult
	10000-20000	4000-15000	5000-10000	5000-10000	4000-10000
Neutrofile	60-70%	25-40%	35-50%	45-60%	50-70%
Eozinofile	1-2%	1-4%	1-4%	1-4%	1-4%
Bazofile	0,4%	0,2%	0,1%	0,1%	0,1%
Limfocite	20-25%	50-70%	45-60%	40-50%	30-45%
Monocite	12%	8%	6%	6%	6%

Variaţii fiziologice ale numărului elemntelor sângelui periferic
HEMOGRAMA

Eritrocite + variaţii după sex:
- bărbat adult 4500000-5500000/mm³.
- femeie adultă 400000-5000000/mm³.

\+ variaţii după vârstă
- la naştere 4500000-7000000/mm³.
- până la 12 ani 4000000-5000000/mm³.

Leucocite
- adulţi 4000-9000/mm³.
- la naştere 15000-25000/mm³.

Trombocite
- valori normale 130000-300000/mm³.

Aceste elemente variază nu numai în funcţie de vârstă după cum se observă şi din tabelul de mai sus ci şi după sex. La aceste variaţii se adaugă cele care survin în cursul unei activităţi musculare mai intense, în timpul digestiei, în funcţie de anotimp, de altitudine (poliglobulie).

În examinarea frotiului de sânge colorat se recomandă ordinea arătată anterior (studiul atent al morfologiei eritrocitelor, a trombocitelor şi apoi a leucocitelor), deoarece, începând cu studiul leucocitelor, atrăgătoare prin variaţiile lor de formă, structură şi culoare, riscăm neglijarea unor detalii, uneori foarte importante ale aspectului hematiilor sau trombocitelor.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.3. *Componentele sângelui perifieric evidenţiate prin colorația May-Grümwald Giemsa*

2.3.3.1. **Eritrocitul** (hematie sau globul roşu) are un diametru de aproximativ 7,2 μm la celula uscată şi 8,6 μm la hematia proaspătă circulantă.

Celulele de origine ale seriei eritrocitare, care duc în cele din urmă la eritrocit, la individul adult normal, se găsesc în măduva roşie, hematopoetică, localizată în special în oasele late şi în epifizele oaselor lungi. Viteza de maturare a celulelor seriei eritrocitare (proeritroblast, macroblast, eritroblast bazofil, eritroblast policromatofil, eritroblast acidofil, reticulocit, eritrocit) este rapidă: trecerea de la eritroblastul bazofil la eritrocit durează 25 ore. În mod normal proeritroblastul este o celulă de rezervă, care nu se divide decât în urma unor stimuli hematopoietici puternici. Eritropoieza este asigurată de diviziunea eritroblaştilor bazofili şi policromatofili. Reticulocitele rezultate, părăsesc măduva şi trec în circulaţie unde se maturează după paroximativ 48 ore trecând în eritrocite mature.

Eritrocitul adult este o celulă anucleată, discoidală şi biconcavă. Este alcătuit din citoplasmă şi membrană celulată. În **citoplasmă** se găsesc în special macromolecule proteice structurale şi protein-enzime precum şi cantităţi mici de lipide, vitamine (mai ales din grupul B) şi elementul principal hemoglobulina.

Membrana eritrocitului care a constituit obiect de cercetare intensă, deoarece prin hemoliza eritrocitului în mediu hipoton ea rămâne în forma sa iniţială, conservând atât organizarea cât şi cea mai mare parte a funcţiilor sale, este alcătuită după tipul unitar de biomembrane. Prezintă pe suprafaţa sa antigeni numiţi aglutinogeni după a căror prezenţă sau absenţă, se pot identifica grupele sanguine, de care se ţine seama în practica medicală când se efectuează transfuzia de sânge. În afara acestora, pe suprafaţa externă a membranei eritrocitare s-a evidenţiat şi factorul Rh.

Eritrocitele au o culoare roşu cărămiziu pe frotiul de sânge colorat cu soluţia May-Grümwald Giemsa şi o formă rotunjită, văzute din faţă şi de disc biconcav văzute din profil (discocite). Alte forme de eritrocite sunt:

- **sferocitele** - eritrocite rotunde de forma unui balon sau a unei sfere; privite pe frotiu ele sunt bine colorate şi mai mici decât eritrocitele normale. Se întâlnesc în icterul hemolitic congenital numit şi sferocitoză ereditară; se mai întâlnesc şi în anemii hemolitice câştigate;
- **echinocitele** sunt hematii de formă sferică ce prezintă pe suprafaţa lor prelungiri de dimensiuni egale -ţepi- în număr de 20-30 localizate

echidistant. Aceste forme apar atunci când concentraţia moleculelor de ATP scade în celulă şi în mediul extracelular. Revenirea la concentraţia normală duce la transformarea echinocitului în discocit. Echinocitele pot apare şi ca forme ireversibile în cazul celulelor îmbătrânite sau în unele boli sanguine.

- **eliptocitele** - eritrocitele ovale care în mod normal se găsesc în sânge, în proporţie de 10-15% din globulele roşii, putând fi întâlnite şi în unele boli sanguine.

- **stomatocitele** - hematii rotunde ce prezintă într-o anumită zonă o înfundătură ca o gură (stomă); ele apar la un pH uşor scăzut sub 7; revenirea pH-ului la normal determină transformarea lor în discocite; în hemoglobinopatii apar forme ireversibile de stomatocite (fig.22).

- **acantocitele** - hematii de formă rotunjită ce prezintă pe suprafaţa lor 5-15 prelungiri de dimensiuni inegale şi situate la distanţe inegale între ele; apar în ciroze, anorexia nervoasă - fiind numite şi "spurr cells".

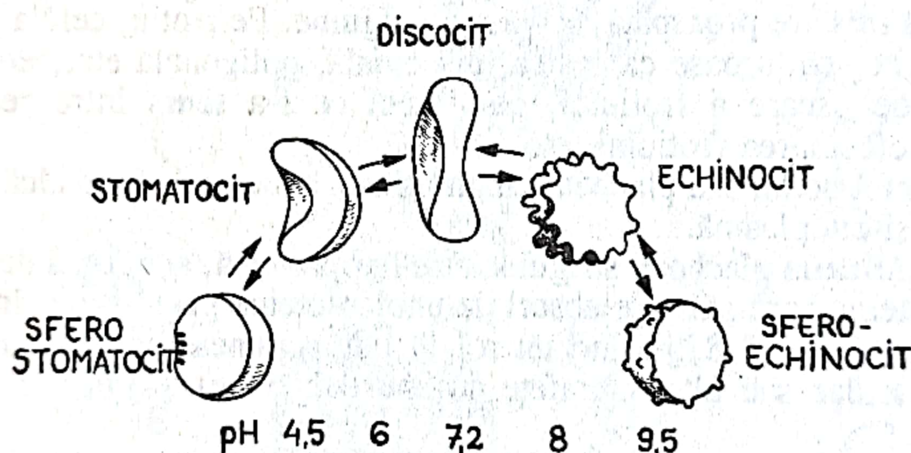


Fig.22. Modificarea formei eritrocitului în funcţie de pH.

- **drepanocitele** - hematii în corn sau seceră; se întâlnesc în hemoglobinopatii, (hemoglobinoza S - drepanocitoza), talasemie şi deficit de fier în organism.

Acantocitele şi drepanocitele sunt forme patologice ireversibile ale hematiei.

Creşterea hematiei determină apariţia **macrocitelor**; când diametrul depăşeşte 10 μm, vorbim de **megalocite** (acestea apar de obieci în boli sanguine-anemii). Scăderea diametrului eritrocitului sub 7 μm determină apariţia în sânge a **microcitelor**. Variaţiile de diametru eritrocitar poartă

denumirea de **anizocitoză**.

Culoarea eritorcitelor se poate modifica, celulele apărând fie palide (hipocromie) în anemii, fie diferit colorate, în tulburările eritropoiezei.

2.3.3.2. Trombocitul

Trombocitele iau naştere în măduva osoasă hematogenă prin fragmentarea citoplasmei elementelor seriei megacariocitare (megacarioblastul, celula cap de serie, megacariocitul bazofil sau promegacariocitul, megacariocitul granulat netrombocitogen, megacariocitul granulat trombocitogen, trombocitul).

Trombocitele se formează deci din citoplasma megacariocitului, prin diferenţierea acesteia, la un anumit stadiu de maturaţie a celulei. Desprinse din megacariocit, trombocitele trec în stadiu de maturaţie, având dimensiuni care variază între 2-5 μm şi o durată de viaţă de circa 7-10 zile. În sângele periferic ele se găsesc în proporţie de 150000-400000/mm^3.

Trombocitul este o "celulă" elipsoidă, cu formă de lentilă biconvexă când se află în stare proaspătă, în vasele sanguine. Pe frotiu, celula prezintă forme diferite, colţuroase ca o stea, discoidală, poligonală etc., depinzând de gradul de uscare a frotiului, de timpul ce s-a scurs între recoltarea sângelui şi efectuarea frotiului, etc.

Tromobocitul sau placheta sanghina este anucleată, fiind alcătuită din membrană şi citoplasmă.

Membrana plachetei sanguine este lipoproteică, acoperită de un strat de glicoproteine care permite absorbţia unor proteine plasmatice, în special fibrinogen şi factorul 8, jucând un rol în interacţiunea dintre trombocit şi peretele vascular sau alte suprafeţe străine (adeziune) şi cu alte plachete (agregare).

Pe suprafaţa externă a membranei celulare se găsesc diferite lucuri specifice antigenice, ca şi receptori pentru agenţii stimulatori sau inhibitori ai procesului de agregare plachetară. Membrana trombocitului mai prezintă şi mici ondulaţii şi prelungiri dendritiforme rare.

Citoplasma se prezintă la examenul microscopic alcătuită din două zone: una externă, ectoplasmică, clară, numită **hialomer** şi alta centrală, întunecată numită **granulomer.**

Hialomerul conţine microtubi, microfilamente şi diferite proteine implicate în procesul de coagulare sanguină (ex: trombosteina).

Granulomerul este un ansamblu de granule şi vacuole de mărimi diferite; el este alcătuit din mitrocondrii mici; câţiva lizozomi ce apar pe frotiu ca granulaţii azurofile, câţiva peroxizomi ce conţin catalază, microvezicule golgiene, puţine profiluri de reticol endoplasmatic şi granule dense ce conţin serotonină, epinefrină (adrenalină), ioni de calciu.

Scanned with OKEN Scanner

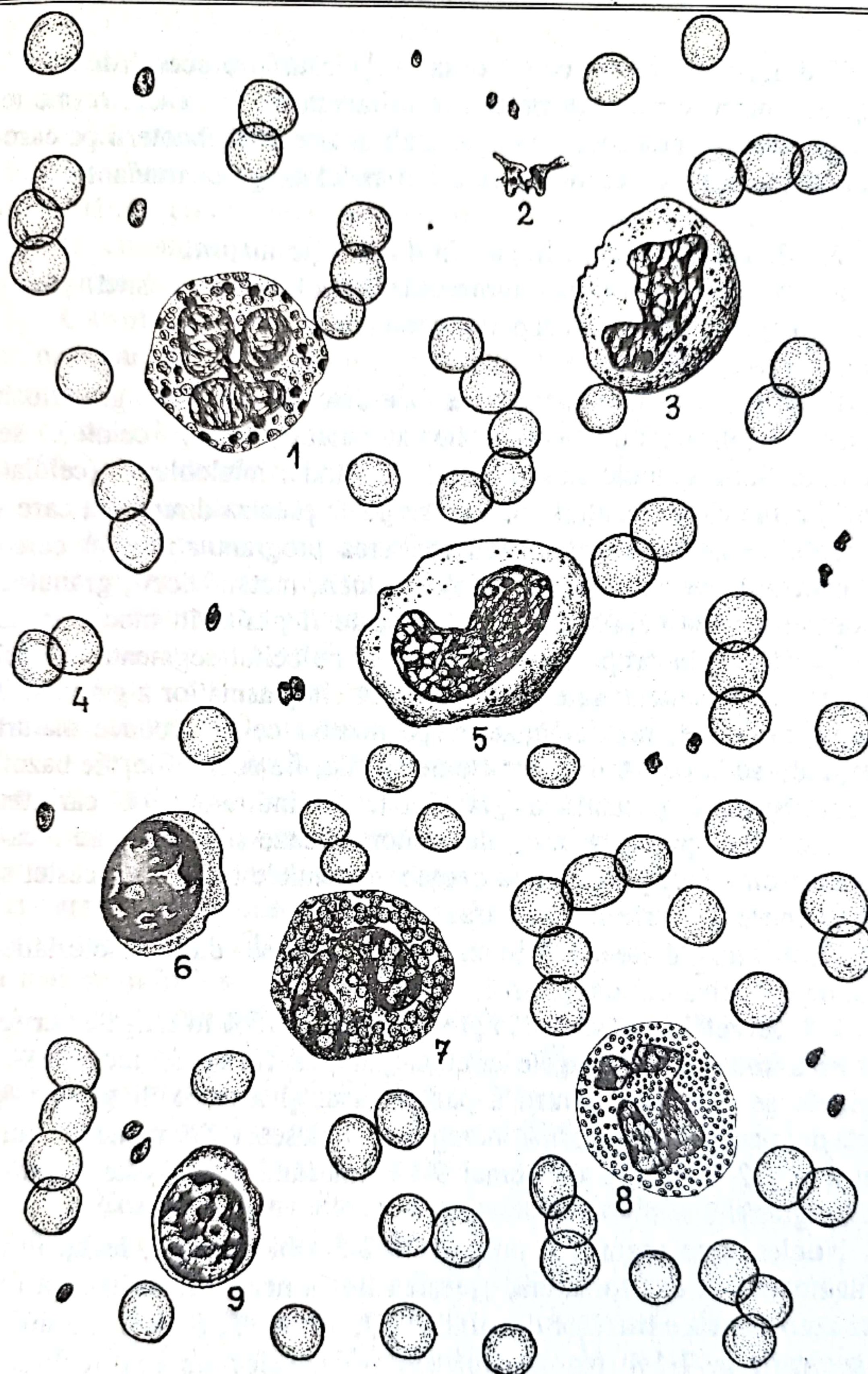


Fig.23. Reprezentarea schematică a elementelor figurate în sângele periferic. 1-bazofil; 2-trombocit; 3-monocit; 4-eritrocit; 5-monocit; 6-limfocit; 7-eozinofi; 8-neutrofil; 9-limfocit.

Scanned with OKEN Scanner

Tromobocitul este o celulă direct implicată în procesul de coagulare a sângelui, intervenind şi în procesele inflamatorii, în reacţiile imune, în vindecarea rănilor; poate endocita particule foarte mici (bacterii pe care nu le omoară, particule de cărbune, curăţind astfel sângele circulant).

2.3.3. **Leucocitele** se împart în două clase majore:

a. *granulocite* (prezintă numeroase granule în citoplasmă) şi

b. *agranulocite* sau leucocite agranulare

a. *granulocitele*

La individul adult, normal, celulele de origine a seriei granulocitare se găsesc localizate în măduva hematopoietică ca şi celulele seriei eritrocitare. Seria granulocitară normală cuprinde: mieloblastul (celula cap de serie), promielocit (stadiul din care se poate preciza direcţia în care va evolua celula, deoarece are loc diferenţierea progranulaţiilor în cele trei tipuri: neutrofile, eozinofile, bazofile), mielocit, metamielocit, granulocitul nesegmentat (prima celulă din serie ce poate fi găsită în mod normal în sângele periferic, în proporţie de 1-5%), granulocitul segmentat. Celulele acestei serii sunt caracterizate prin apariţia în citoplasma lor a granulaţiilor, la început azurofile, nediferenţiate şi pe măsură ce se produce maturaţia diferenţiindu-se în cele trei tipuri: fie neutrofile, fie eozinofile, fie bazofile. O caracteristică importantă a granulocitelor, indiferent de caracterele granulaţiilor, este prezenta în celule a unor oxidaze şi peroxidaze încă din stadiul de promilocit, prin care se deosebesc celulele tinere ale acestei serii de celule tinere ale seriei limfocitare.

Deci granulocitele se împart în trei clase după tinctorialitatea granulelor specifice din citoplasmă:

1. **Neutrofilele** se găsesc în proporţie de 40-75% în sângele periferic; au o formă rotunjită în sângele circulant; acestă formă se modifică când neutrofilele se detaşează pentru a părăsi vasul şi a trece în ţesuturi prin emitere de pseudopode (formă neregulată, adeseori de rachetă); au un diametru de 12-15 μm şi de numai 9-12 μm când celula este uscată (pe frotiul sanguin).

Nucleul este segmentat prezentând 2-5 lobi nucleari, legaţi între ei prin filamente fine de cromatină; aşezarea lor în neutrofil realizează forme diferite asemănătoare literelor din alfabet (U, V, W, T, S etc.). La unul din lobii nucleari, la 1-5% din neutrofilele persoanelor de sex feminin, se observă prezenţa corpusculului Barr, condensarea în intercineză a unuia din cei doi cromozomi X.

La bărbaţi cromozomul Y este mult mai mic ca dimensiuni şi nu

poate fi observat la examenul obişnuit cu microscopul fotonic; cu greu poate fi observat la 3,5% din neutrofile prin examenul cu florescenţă, după colorare cu chinacrină. Corpusculul sexual apare la microscop ca o prelungire a lobului nuclear, sub forma unui băţ de tobă. Cu cât neutrofilul este mai tânăr, cu atât numărul lobilor nucleari este mai mic.

În coloraţia utilizată (May-Grüwald Giemsa) nucleii neutrofilelor prind o tentă roşie violacee dată de eozinatul de albastru de metilen.

Citoplasma neutrofilelor este uşor acidofilă colorându-se în roz palid. Conţine organite celulare puţin dezvoltate şi elementul structural caracteristic este reprezentat de numeroase **granule** ce diferă ca diametru şi colorabilitate de la o specie la alta (heterofile); la om, numărul lor diferă de la o celulă la alta (50-200). Granulele neutrofilului sunt de două tipuri:

- **granule azurofile** sau **primare** prezente în exclusivitate în primele etape de dezvolatre a neutrofilelor la nivelul măduvei hematogene, reducând-se treptat pe măsura diferenţierii celulei şi trecerii ei în sângele periferic. Ele sunt lizozomii neutrofilelor şi conţin hidrolaze acide, lizozim ce are rolul de a hidroliza glicozidele din peretele bacteriilor-**agent bacteriostatic**; mai conţin mieloperoxidază prin care sunt **bactericide** acţionând asupra H_2O_2, (eliberează şi activează O_2).
- **granule specifice** sau **secundare** ce conţin lizozim, lactoferin (complex enzimatic cu rolul de a lega fierul circulant, sustrăgându-l bacteriilor, care astfel nu se vor mai putea dezvolta intrând într-un ciclu involutiv), fagocitine, cu rol bacteriostatic, fosfatază alcalină, acid lactic, acizi graşi şi lecitine, toate având rol inhibitor asupra dezvoltării microorganismelor. Ele se colorează cu tehnica prezentată în brun mai mult sau mai puţin închis.

Membrana celulară este lipoproteică, acoperită de glicocalix; ea emite frecvente pseudopode bogate în microfilamente de actină şi microtubi ce asigură migrarea celulei din sânge, către şi prin ţesuturi.

Dintre **funcţiile** neutrofilului amintim faptul că este un microfag (fagocitează particule de talie mică).

2. **Eozinofilele** numite şi granulocite acidofile se găsesc în proporţie de 1-5% din elemente le seriei albe.

Nucleul este de obicei bilobat-doi lobi uniţi prin punţi fine de cromatină, lobii nucleari conţinând eucromatină dispusă central şi heterocromatină lângă membrana nucleară. În coloraţia May-Grünwald Giemsa nucleul are o tentă roşu violaceu.

Citoplasma este intens acidofilă, se colorează în roz, conţine organite celulare mai bine reprezentate ca în citoplasma neutrofilului şi frecvente

granule colorate în portocaliu strălucitor în colorația May-Grünwald Giemsa. Granulele eozinofilului conțin hidrolaze acide de tip lizozomal și histone - după unii autori conțin histamină sau acetillcolină.

Membrana este organizată după tipul general al biomembranelor, la nivelul ei apărând pseudopode rare și mici, celula prezentând mișcări ameboide.

Dintre **funcțiile** eozinofilului amintim faptul că este un microfag cu putere redusă de fagocitoză, selectivă pentru factorii bacterieni solubili. Are și un rol antihistaminic acumulându-se în țesuturile sau zonele cu histamină în concentrație ce depășește normalul, intervenind astfel în bolile parazitare și alergice ce sunt însoțite de eozinofilie. În tumori, în special în boala Hodgkin, eozinofilele prezintă reacții de tip imun. Ele conțin și profribrinolizină prin care se pare că intervin în procesele de coagulare sanguină.

3. **Bazofilele** se găsesc în sângele periferic în proporție de 0,5% din elementele albe, sunt mai mici decât neutrofilele și eozinofilele, au o formă ușor rotunjită; **nucleul** apare incomplet segmentat având adesea forma unei frunze incomplet lobate, a literei "S", sau de trifoi; **citoplasma** este bazofilă, conține puține organite celulare dar mai multe **granule**, de formă și dimensiuni diferite, ce apar colorate metacromatic în albastru-vilet închis.

În unele bazofile, granulele sunt răspândite pe toată aria citoplasmei acoperind deseori și nucleul în timp ce în altele apar concentrate în ectoplasmă sau perinuclear. Ele sunt foarte sensibile, dispar repede în apă datorită glicozamino-glicanilor acizi pe care îi conțin. O parte din aceste granule sunt lizozomi dar, cele mai multe, pot fi considerate granule specifice ce conțin histamină, heparină, serotonină și o substanță slab reactivă de natură lipidică, probabil din același grup cu prostaglandinele.

Membrana este lipoproteică acoperită de glicocalix și prezintă pe suprafața externă receptori pentru Ig.E.

Bazofilele intervin în stări inflamatorii, stări de șoc, se stress datorită substanțelor conținute în granulele specifice, pe care le eliberează la contactul cu unii antigeni, deplasându-se în țesuturi prin mișcări ameboide.

b. *leucocite agranulare*

1. **Limfocitul**

Celulele de origine a seriei limfocitare se găsesc în foliculii limfatici ai ganglionilor limfatici, în foliculii limfatici diseminați în organism etc.

Seria limfocitară normală cuprinde: limfoblast, prolimfocit, limfocite cu dimensiuni și caracteristici morfologice variate în funcție de gradul lor de maturitate. Limfoblastul și prolimfocitul în mod normal nu trec în sângele

periferic.

Limfocitul se găseşte în sânge în proporţie de 25-45% din elemente albe. Limfocitul circulant este rotunjit sau uşor oval.

Nucleul limfocitului este mare şi ocupă o porţiune întinsă din citoplasmă. În interiorul lui se găseşte o cantitate mare de heterocromatină sub formă de bulgări bazofili, ceea ce face ca în frotiul de sânge să apară tahicromatic, intens colorat, ca o pată de cerneală.

Citoplasma este redusă la un inel perinuclear, este bazofilă, asemănată cu cerul senin; conţine organite celulare slab reprezentate şi deseori câteva granulaţii azurofile.

Membrana este lipoproteică, organizată în mozaic şi acoperită cu un strat subţire glicoproteic.

Limfocitele prezintă mişcări de locomoţie foarte active, înaintând tot aşa de rapid ca granulocitele dar nu fagocitează; în mişcare iau adesea forma de oglindă cu mâner (citoplasma+nucleul); prezintă deasemenea şi mişcări intracitoplasmatice foarte vii, ce deplasează organitele dintr-o parte în alta în citoplasmă.

2. **Monocitul**

Originea monocitelor este în sistemul reticulo-histiocitar în toate organele şi ţesuturile. Monoblastul, care dă naştere monocitului circulant, ia naştere din celula reticulară, nu numai din organele hematopoietice dar şi din toate ţesuturile: se întâlneşte atât în amprentele de organe (ca plămâni, ficat) cât şi în cele din ţesutul subcutanat. Seria monocitară cuprinde: monoblast (în stare normală fiind imposibil să se prevadă dacă un monoblast va evolua sau nu spre un monocit), promonocitul (stadiu mai diferenţiat ce permite un diagnostic citologic; el rămâne în mod normal în ţesuturi; dacă evoluează spre monocit, citoplasma se încarcă cu numeroase granulaţii azurofile, devine o celulă matură , monocitul (forma matură a seriei) care se găseşte în mod obişnuit în sângele periferic.

Monocitul se găseşte în sângele periferic în proporţie de 6-8% din elemente albe, are o formă rotunjită, este cea mai mare celulă din sângele periferic 20-25 μm.

Nucleul nesegmentat apare deseori uniform. Cromatina are un aranjament mai particular, asemănător cu o tablă de şah în care heterocromatina reprezintă zonele întunecate iar eucromatina zonele clare.

Citoplasma este abundentă, bazofilă, se colorează în albastru-cenuşiu ca cerul înainte de furtună. În citoplasmă se găsesc organite celulare relativ abundente, granule azurofile (lizozomi) concentrate în scobitura nucelului şi uneori resturi celulare pe cale de dezintegrare, celulele fiind macrofage.

Scanned with OKEN Scanner

Membrana celulară este lipoproteică şi prezintă numeroase microvilozităţi, vezicule de pinocitoză şi micropinocitoză. Membrana emite frecvent pseudopode prin care monocitul se deplasează în afara vasului, dar mai încet decât granulocitul. Membrana monocitului, ca şi a macrofagului, forma sa activă, conţine receptori pentru Ig.G. (subclasele Ig.G_1 şi Ig.G_3) şi pentru C_3. În ceea ce priveşte funcţiile monocitului amintim doar rolul său major: fagocitează în general particule de talie mare (bacterii, virusuri, complexe antigen-anticorp, corpuri străine anorganice, celule întregi sau resturi de celule).

2.3.4. *Tehnica frotiului din materialele biologice provenite din organe uşor accesibile care prezintă o descuamare fiziologică*

Aceste preparate se fac din secreţiile: vaginale, mamare, bronşice, prostatice şi din celule provenite din descumarea epiteliilor mucoaselor: bucală, nazală, oculară.

Recoltarea acestor materiale se face cu ajutorul unor spatule din sticlă, din metal sau tampoane sterile de vată sau tifon după care se etalează într-un strat subţire pe lame port-obiect degresate.

Imediat după efectuarea frotiului, fără a-l usca, lamele se introduc într-un amestec de alcool etilic absolut şi eter în părţi egale timp de 15 min., putându-se folosi şi alte amestecuri fixatoare în raport de ceea ce dorim să obţinem. După fixare urmează colorarea.

2.3.5. *Tehnica frotiului din materiale biologice provenite din organe mai puţin accesibile*

Aceste materiale biologice provin din spălăturile gastrice, puncţiile pleurale şi peritoneale (pleurezie, ascită, puncţii ganglionare, etc).

În cazul în care aceste probe nu pot intra imediat în lucru, pentru conservarea celulelor este necesară fixarea lor. Cel mai bun fixator este alcoolul etilic 50%; pentru aspiratele gastrice se utilizează alcoolul etilic 95%.

Produsele care urmează a fi examinate prin această metodă, fixate sau nu, se centrifughează la 1500-400o turaţii/minut timp de 10-30 min. După centrifugare lichidul supernatant se îndepărtează iar din sediment, cu o ansă se ia o picătură şi se depune pe o lamă de sticlă pe care s-a întins un strat subţire de albumină Mayer. Chair dacă lichidele biologice au fost fixate cu soluţia de alcool etilic 50%, frotiurile umede obţinute din ele se fixează timp

de 15 min. într-o baie cu alcool etilic absolut - eter în părţi egale. Urmează colorarea.

2.3.6. *Tehnica amprentelor de organe*

Organul de examinat se secţionează transversal prin zona care prezintă interes diagnostic. Secţionarea se face cu un bisturiu sau lamă bine ascuţite pentru a evita deformarea sau strivirea ţesuturilor.

Cu ajutorul unei pense se prinde fragmentul ales şi se apasă uşor cu faţa secţionată pe lama portobiect degresată. Se fixează cu alcool etilic absolut - eter în părţi egale timp de 15 min. după care se colorează.

2.3.7. *Tehnica colorării frotiurilor din sedimente celulare şi amprente de organe*

Frotiurile de celule epiteliale descuamate sau exfoliate (cavitate bucală, vagin, prostată, uretră etc.), de sedimente celulare (urină, suc gastric, bilă, lichid cefalorahidian, lichid pleural, lichid ascitic) sau amprentele de ţesuturi sau organe parenchimatoase se pot colora cu May-Grümwald Giemsa sau hemalaun eozină după tehnica descrisă în capitolele anterioare.



Scanned with OKEN Scanner

III COLORAREA ŞI COLORANŢII ÎN BIOLOGIA CELULARĂ

3.1. COLORANŢII ŞI MECANISMELE COLORĂRII

Capitolul cuprinde noţiuni fundamentale privind coloranţii şi mecanismele generale ale colorării precum şi importanţa acestora pentru evidenţierea unor structuri celulare.

Colorarea structurilor celulare şi tisulare este un fenomen foarte complex şi încă incomplet elucidat, în care intervin factori fizici şi mecanisme chimice.

3.1.1. *Coloranţii. Generalităţi.*

Toţi coloranţii, în sensul strict al termenului utilizat în tehnica citologică, sunt compuşi organici, marea lor majoritate corespunzând seriei aromatice. Un colorant este un produs ce poate colora durabil o substanţă sau un ansamblu de substanţe. Pentru aceasta au nevoie de:

1. grupări atomice specifice ce conferă culoarea numite **cromofore**
2. grupări ce permit o fixare permanentă pe substanţa de colorat numite grupări **auxocrome**.

Numărul grupărilor cromofore este destul de mare; tabelul de mai jos prezintă formulele structurale ale principalelor grupări cromofore prezente în coloranţii utilizaţi în citologie.

Se ştie că fenomenul "culoare" este legat de absorbţia selectivă de către o substanţă dată a unor anumite lungimi de undă din spectrul vizibil astfel încât lumina reflectată de acestă substanţă apare colorată; responsabile de această absorbţie selectivă sunt grupările cromofore. Compuşii organici ce conţin grupări cromofore sunt numiţi şi "cromogeni".

Cromogenii nu sunt obligatoriu cloloranţi deoarece ei necesită prezenţa unei grupări ce le conferă proprietatea de a se ioniza, permiţându-le fixarea grupărilor auxocrome.

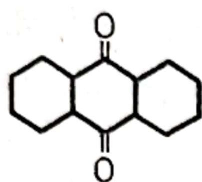
Grupările auxocrome din punct de vedere chimic sunt, cel mai ades, funcţii simple, fără duble legături, polare sau semi-polare. Grupările hidroxil, amino, carboxil, cian, sulfonil sunt principalii auxocromi.

Grupări chimice care nu sunt nici cromofore nici auxocrome pot interveni modificând culoarea unui colorant; printre acestea sunt grupări metil, fenil etc.

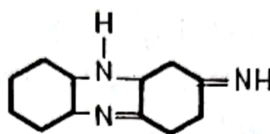
Se admite existenţa unui raport între puterea de colorare a compuşilor cu duble legături conjugate şi schimbarea rapidă a configuraţiei moleculare, acesta jucând un rol esenţial alături de absorbţia undelor electromagnetice. Legăturile duble cu electroni mobili, sunt la originea caracterului cromofor a grupărilor nesaturate.

Scanned with OKEN Scanner

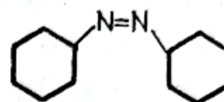
Principalele grupări cromofore



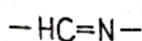
antrachinonă



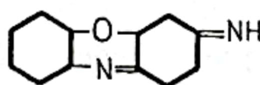
azină



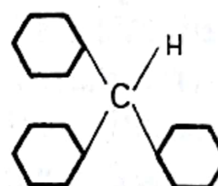
azoică



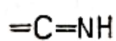
azometină



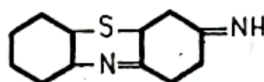
oxazină



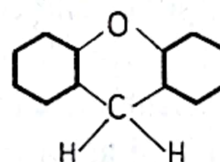
trifenilmetan



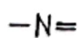
cetimină



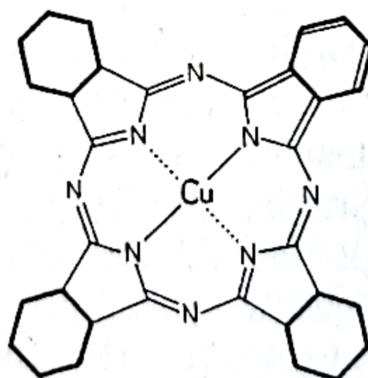
tiazină



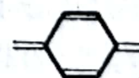
xantină



indamină



ftalocianină



chinonă

3.1.2. *Clasificarea coloranţilor*

Coloranţii utilizaţi în citologie pot fi clasificaţi după mai multe criterii:

1. *După origine*:

- **naturali**, de origine vegetală (hematoxilină, safranină) sau de origine animală (carminul)
- **sintetici** (albastru de metil, etc.)

2. *După natura auxocromilor* ce determină şi comportamentul lor în soluţie, coloranţii se împart în:

a. **coloranţi acizi** sau anionici
b. **coloranţi bazici** sau cationici
c. **coloranţi neutri**

Termenul de acid sau bazic nu se referă la caracterul acid sau bazic al soluţiilor colorante; clasificarea se referă la auxocromi:

a. Coloranţii conţinând **auxocrom anionic** (ex: CO_2H) sunt **coloranţi acizi** ce colorează componentele subcelulare încărcate pozitiv; cel mai utilizat colorant acid este eozina ce colorează în roz citoplasma.

b. **coloranţii bazici** conţin **auxocromi cationici** (ex: NH_2). Ei colorează componentele subcelulare încărcate negativ, cei mai utilizaţi fiind: tionina, violet de metil, hemalaunul.

c. **coloranţii neutri** sunt purtătorii de **grupări cationice** şi **anionice**; se obţin din soluţii apoase de coloranţi bazici şi coloranţi acizi amestecate în anumite proporţii; de ex: eozinatul de albastru de metilen şi eozinatul de azur de metilen.

3.1.3. *Mecanismele colorării*

Mecansimele fixării coloranţilor pe structurilor celulare sau tisulare sunt complexe, realizându-se prin intermediul unor factori fizici şi a unor mecanisme chimice în proporţii variabile. Marea majoritate a reacţiilor de colorare au însă o explicaţie în special chimică; proteinele ce nu sunt extrase în cursul prelucrărilor ce preced colorarea, reprezintă substratul molecular la nivelul căruia se ataşează coloranţii. Anumite coloraţii nu par să evidenţieze decât parţial mecanisme chimice, de aceea s-au luat în considerare şi unii factori fizici printre care:

1. *penetrarea pur mecanică* a colorantului în interiorul anumitor structuri tisulare prin osmoză sau capilaritate;

2. *adsorbţia* ce joacă un rol important în coloraţiile diferenţiale a

unor elemente tisulare (anumiţi ioni fiind adsorbiţi mai uşor decât alţii de anumite substanţe) şi în fenomenele de mordansare, atât de importante în anumite tehnici citologice;

3. *absorbţia* legată de structura fizică a constituienţilor tisulari.

3.1.4. *Principalele metode de colorare*

Tehnicile de colorare se clasifică după următoarele criterii:

1. *Numărul coloranţilor utilizaţi:*

- **simple**, când se foloseşte un singur colorant, fie nuclear (hematoxilina), fie citoplasmatic (eozina);

- **combinate**, când secţiunile se colorează succesiv cu doi sau mai mulţi coloranţi (dublă: hematoxina-eozina, tripla-hematoxilina-eozina-albastru de metilen) sunt folosite pentru colorarea în mod diferenţial a diverse elemente ale unui ţesut şi a facilita astfel analizarea structurii lui.

2. *Utilizarea unor adjuvanţi:*

- **directă**: colorantul se fixează prin simplul contact cu secţiunea (colorarea cu hematoxilin-eozină);

- **indirectă sau prin mordansare** - necesită prezenţa unui mediator sau mordant (alaunurile, iodul, sărurile de fier, etc.) care fixează colorantul de componentele celulare; combinaţia dintre colorant şi mordant se numeşte **lac.**

3. *Intensitatea colorării*

- **progresivă** - se fac încercări succesive sub control microscopic până se ajunge la tenta de culoare optimă a structurii celulare după care se opreşte colorarea prin spălare (de ex: hemalaunul colorează nucleii tuturor tipurilor de celule în albastru, în 4-6 minute; dacă lăsăm secţiunile mai mult timp în contact cu colorantul, se colorează şi alte structuri celulare);

- **regresivă** - se face o supracolorare care prinde şi alte structuri celulare decât cele dorite, după care, excesul de colorant, este îndepărtat prin substanţe decolorante sau diferenţiatorii (de ex: după ce am colorat secţiunea în negru intens cu hematoxilină ferică Heindenhain, introducem lama într-o soluţie de alaun de fier amoniacal până în momentul în care a rămas colorată numai cromatina nucleară, celelalte elemente celulare-mitocondriile, centrul celular-decolorându-se).

4. *Starea materialului*

- **coloraţia vitală** se face pe celule în stare vie prin utilizarea unor coloranţi vitali şi care persistă numai atât timp cât supravieţuieşte celula; se utilizează pentru evidenţierea unor organite celulare (mitrocondrii-verde

Janus B sau complex Golgi-roşu neutru) şi a unor activităţi fiziologice celulare.

- **coloraţia permanentă** se face prin colorarea unor preparate permanente.

3.1.4.1. **Colorarea secţiunilor la parafină** necesită o serie de timpi executaţi înainte şi după coloraţia propriu-zisă.

a. _etapa de precolorare cuprinde:_

1. *Deparafinarea* - secţiunile parafinate lipite pe lamă se deparafinează trecându-le prin băi succesive cu solvenţi ai parafinei: xilol, benzen, toluol 5-10 min. , deoarece parafina împiedică colorarea.

2. *Hidratarea* - este necesară eliminarea solventului parafinei pentru a face posibilă colorarea. Se realizează prin trecerea secţiunilor în 5 băi de alcool etilic în concentraţii descrescânde (3 băi cu alcool absolut, apoi 96% şi 70%) timp de 1-2 min.

Apoi secţiunile se trec în apă distilată dacă soluţia colorantă este apoasă. În cazul folosirii unei soluţii colorate alcoolice se efectuează aceleaşi operaţii, omiţându-se trecerea în apă distilată, secţiunile transferându-se direct în soluţiea colorantă alcoolică.

b. _colorarea propriu-zisă_

c. _etapa de postcolorare_

1. *Spălarea* cu apă distilată este necesară pentru orpirea colorării şi îndepărtarea execesului de colorant.

2. *Deshidratarea* este absolut necesară pentru obţinerea unui preparat microscopic permanent. Se face prin trecerea secţiunilor colorate prin 5 băi de alcool etilic de concentraţii crescânde (70%, 96% şi 3 băi cu alcool etilic 100%).

3. *Clarificarea* îndepărtează alcoolul din secţiuni şi le conferă o transparenţă necesară examinării lor la microscop; se face prin trecerea secţiunilor în trei băi succesive de xilol, toluol, benzen.

4. *Montarea lamelei pe secţiunile colorate*

Montarea are triplu scop; protecţia mecanică a secţiunilor, conservarea cât mai mult timp posibil a coloraţiilor sau recţiilor histochimice şi obţinerea unui grad de transparenţă şi a unui indice de refracţie avantajos din punct de vedere optic.

Mediile de montare folosite în realizarea unor preparate microscopice permanente pot fi:

a. **apoase** (miscibile cu apa): glicerină-gelatină, sirop Apathy, etc. Se folosesc în cazul în care secţiunile nu au fost deshidratate. Indicile lor de

refracţie este însă net inferior faţă de cel al mediilor anhidre, ceea ce reprezintă un inconvenient deoarece este vorba de secţiuni colorate; de asemenea, un număr mare de coloraţii nu se conservă bine în aceste medii.

b. **mediile de montare miscibile cu alcoolul** - necesită o deshidratare a preparatelor mergând până la alcool 80^0 sau chiar 85^0. Folosirea lor este indicată atunci când se doreşte evitarea folosirii alcoolului absolut şi a hidrocarburilor benzenice necesare când se foloseşte balsamul de Canada sau alte răşini sintetice. Cel mai utilizat dintre aceste medii miscibile cu alcoolul este **euparolul** (Gilson 1906). După mulţi autori, conservarea majorităţii coloraţiilor şi reacţiilor histochimice este foarte bună. Avantajul principal al utilizării pentru montare a euparolului este evitarea deshidratării prin alcool absolut a secţiunilor în celoidină nelipite: este indicaţia principală a acestui procedeu.

Montarea propiru-zisă se realizează punând 1-2 picături din mediul de montare pe lama cu secţiunea lipită şi colorată pe care se aplică apoi o lamelă de sticlă.

În această etapă, esenţială este manipularea lentă a lamelei pentru a se evita formarea bulelor de aer între lamă şi lamelă.

Scoaterea bulelor de aer se face prin apăsarea uşoară pe lamelă cu un ac de disociat. Preparatele astfel montate se pun la termostat la 37^0C, 10-12 ore sau la temperatura camerei dar ferite de praf 1-2 zile, în vederea uniformizării grosimii stratului şi uscării mediului de montare.

c. **anhidre**, răşinoase (miscibile cu hidrocarburi benzenice) ex: balsam de Canada ce necesită nu numai deshidratarea completă a secţiunilor dar şi impregnarea cu un solvent al materialului de montare, deci cu o hidrocarbură benzenică. Alături de balsamul de Canada se pot folosi şi alte răşini sintetice.

5. *Etichetarea preparatului* este ultima etapă în obţinerea unui preparat microscopic permanent: constă în lipirea unei etichete pe port-obiect, pe faţa cu secţiunea colorată, pe care se trec datele înregistrate în condica de lucru şi coloraţia făcută. Preparatele microscopice se păstrează în cutii sau histoteci, ferite de lumină şi praf.

3.1.4.2. **Tehnica colorării cu hemalaun-eozină (HE).**

Coloraţia cu hemalaun-eozină este probabil cea mai răspândită coloraţie de rutină în majoritatea laboratoarelor de citologie normală şi patologică, fapt ce impune şi justifică necesitatea cunoaşterii acesteia. Metoda coloraţiei cu hemalaun-eozină foloseşte succesiv un colorant nuclear

bazic, hemalaunul (hemateină+alaun de K) şi un colorant citoplasmic, acid, care este în general eozina.

Hematoxilina este un compus natural, de origine vegetală (extrasă din Haematoxylon campechianum) a cărui utilizare pentru colorarea ţesuturilor vegetale sau animale era cunoscută de indigenii din America centrală înainte de cucerirea spaniolă. Introdusă apoi în Europa, a fost utilizată în industria textilă.

Formula ei stabilită încă din 1810 de Chevreul este: $C_{16}H_{14}O_6$. Se ştie de asemenea că hematoxilina însăşi nu este un colorant şi că ea capătă această proprietate după oxidarea în hemateină ($C_{16}H_{12}O_6$- pierderea celor doi atomi de hidrogen făcându-se fără intrarea oxigenului în moleculă).

Oxidarea hematoxilinei, denumită curent maturare, se face:

- prin **maturare naturală** - expunere prelungită la aer;
- prin **maturare artificială** - tratare cu agenţi oxidanţi;

Se preferă însă procesul de maturare lentă, naturală. Hemateina utilizată în tehnica citologică sub formă de lacuri, prin mordansare cu un alaun (alaun de K), se numeşte hemalaun.

Ea permite obţinerea unei coloraţii nucleare bune în albastru violet. Numărul formulelor de hemalaun folosite este mare (ex: hemalaunul Hansen, Mason, etc.).

Eozina. Există în realitate mai mulţi coloranţi care poartă numele de eozină. Toţi sunt derivaţi de xantină şi mai precis din fluoresceină. Printre ei este şi eozina Y (sau eozina galbenă) care dă cele mai bune rezultate în asociere cu hemalaunul.

Acest colorant este sarea de sodiu a derivatului tetrabromat al fluoresceinei. Mai este numit şi eozina hidrosolubilă. Derivaţii săi metilaţi şi etilaţi sunt mult mai puţin folosiţi (eozina etilată sau eozina S, solubilă în alcool este utilizată pentru punerea în evidenţă a corpusculilor Negri ai turbării).

Eozina B sau albăstră, derivatul dibromat al dinitrofluoresceinei, este utilizată mai rar ca eozina Y în asociere cu hemalaunul, dovedindu-se utilă atunci când este combinată cu azur A sau albastru de toluidină.

Timpii acestei metode sunt:

1. operaţiunile etapei de precolorare: deparafinare, hidratare.
2. colorarea propriu-zisă ce cuprinde:

a) introducerea secţiunilor hidratate într-o baie care conţine hemalaun, timp de 5-10 min;

b) spălarea în apă curgătoare 5-10 min;

c) diferenţierea în alcool clorhidric (alcool 96^0 - 100 ml. soluţie acid

clorhidric - 0,5 ml.) când nucleii sunt supra coloraţi. Pentru virare, secţiunile se trec în soluţia saturată de carbonat de litiu;

d) introducerea secţiunilor spălate într-o baie cu soluţie apoasă de eozină 1% timp de 1-2 min;

e) spălarea secţiunilor timp de câteva secunde în apă distilată pentru eliminarea excesului de colorant;

h) sugativarea uşoară.

3. operaţiunile etapei de postcolorare:

deshidratare, clarificare, montarea lamelei, etichetare.

Rezultate.

- *nucleii* apar coloraţi în albastru violet cu hemalaun. Hemalaunul este un colorant bazic deci, conţinutul nuclear este bazofil (principalii constituenţi chimici ai nucleului, ADN şi ARN, posedă radicali fosfat acizi ce reprezintă locuri de ataşare pentru colorantul bazic-hemalaunul).

- *citoplasma* se colorează în roz cu eozina. Eozina este un colorant acid, deci citoplasma este acidofilă (cele mai multe proteine citoplasmatice se comportă la pH-ul respectiv ca baze, expunând grupările NH_3^+ care, reprezintă locul de ataşare pentru colorantul acid-eozina).

În cazul în care se folosesc secţiuni de ficat uman pentru colorare cu HE se observă: hepatocitele dispuse în cordoane celulare, separate prin spaţii în care sunt capilarele sanguine (sinusoide); în citoplasma acidofilă a hepatocitelor pot fi observate uneori formaţiuni granulare bazofile, colorate în albastru-violet-**corpii Berg** - ce reprezintă ergastoplasma (aglomerări de REG suficient de mari pentru a fi detectate la microscopul fotonic) cantitatea mare de ARN, datorată ribozomilor ataşaţi membranei RE, reprezintă substratul acestei bazofilii.

- spaţiile goale, necolorate în citoplasma hepatocitelor; aceste spaţii goale reprezintă locurile ocupate de: **incluziuni granulare de glicocen** (ce nu se colorează cu HE), spaţiile ocupate de granulele de glicogen apar neregulate şi cu un contur neclar; **incluziuni granulare lipidice** - locurile ocupate de acestea, apar sub formă sferică.

3.1.4.3. Coloraţii nucleare

Coloraţiile nucleare utilizează coloranţi bazici: hematoxilina, kernechtrot, albastru de toluidină, safraniană, etc.

1. *Coloraţia cu hematoxilină ferică Heidenheim*.

Cel mai utilizat colorant este hematoxilina ferică Heidenheim care oferă detalii structurale nucleare preţioase; el mai evidenţiază incluziuni celulare

şi striaţiile muşchilor striaţi.

a. Se prepară o soluţie mamă de hematoxilină 10% în alcool etilic 96^0 care se lasă să se matureze la lumină 2-3 săptămâni.

b. Prepararea soluţiei colorante 1%.

- soluţie hematoxilină 10%.....10 ml.
- apă distilată.....................90 ml.

c. Înaintea colorării, preparatele vor fi **mordansate** (operaţie intermediară între fixare şi colorare care are drept scop creşterea selectivităţii pentru colorant a structurii citologice).

Mordantul utilizat:

- alaun de fier şi amoniu (cristale violete)....3 g.
- apă distilată...............................100ml.

d. **Diferenţiatorul** este tot o soluţie de alaun, de o concentraţie mai mică.

- alaun de fier şi amoniu (cristale violete)......1-2 g.
- apă distilată......................................100ml.

e. **Tehnica de lucru**. Secţiuni la parafină sunt aduse la apă.

- Mordansare pentru nucleu 30 min, pentru alte structuri până la 24 ore.
- Colorare hematoxilină Heidenheim 1%....30 min-24 ore.
- Spălare rapidă în apă distilată.
- Diferenţiere sub microscop.
- Spălare în apă distilată.
- Colorare de fond.
- Deshidratare, clarificare şi montare în balsam de Canada.

f. **Rezultate**: cromatina apare colorată în negru-albăstrui, citoplasma incoloră; coloraţia prelungită mai pune în evidenţă centrosonii, granulele de secreţie.

2. *Colorarea cromatinei sexuale (corpuscul BARR).*

Studiul cromatinei sexuale şi poate face pe frotiuri de mucoasă bucală sau vaginală, amprente de biopsii cutanate şi pe secţiuni la parafină. Rezultatele cele mai bune le oferă variantele clasice ale metodei Feulgen şi Rossenbeck (pentru acizii nucleici). Prezentăm mai jos tehnica propusă de Klinger şi Ludwig (1957) care dă rezultate mulţumitoare şi e mai puţin laborioasă.

a. Fixare în alcool etilic 96^0 pentru frotiuri timp de 30 min-3 ore, pentru piese din ţesuturi sau organe, fixarea se face în lichidul Davidson.......3-24 ore.

- alcool etilic 96^0.....30 ml.
- formol 40%.........20 ml.

Scanned with OKEN Scanner

- acid acetic..........10 ml.
- apă distilată.........30 ml.

b. Secţiuni deparafinate şi deshidratate.

c. Hidrolizare soluţie HCl 5N......20 min.

d. Spălare în apă distilată.

e. Colorare 15-60 min. în amestecul:

- soluţie saturată de tionină în alcool etilic 50^0.....40 min.
- tampon Michaelis pH 6,4.
    - soluţie HCl 0,1 N.........19,6 ml.
    - veronal sodic 0,1 M.....20,4 ml.

f. Spălare repetată în apă distilată, apoi în alcool etilic 50^0.

g. Îndepărtarea excesului de colorant cu alcool etilic 70^0.

h. Deshidratarea, clarificare, montare în balsam Canada.

i. **Rezultate**: corpusculul Barr este colorat în albăstru intens, alţi cromozomi în albăstru deschis, fibrina şi mucinele metacromatice (roşu la violet).

3. *Colorarea nucleolilor.*

Nucleolii, structuri constante ale nucleilor celulelor eucariote, de formă sferică, foarte refringenţi în celula vie, în general omogeni în microscopia fotonică pe preparate fixate, cu aspect electronodens, este implicat în sinteza ARN ribosomal care se acumulează la acest nivel, înainte de a trece în citoplasmă.

Datorită componenţei cromosomiale situată la exteriorul nucleolului, metoda lui Estable şi Sotelo pune în evidenţă această structură periferică numită nucleolonemă (metoda pyrogallol-fer).

a. Fixarea în formol, amestec Sanfelice sau alţi fixatori pe bază de trioxid de crom.

b. Secţiuni deparafinate şi hidratate.

c. Imersia secţiunilor într-o soluţie apoasă de alaun de fer 3%.......1-2 min.

d. Spălare rapidă în apă distilată.

c. Imersia secţiunilor într-o soluţie apoasă de fericiaură de K 1% în care, după 30 secunde se adaugă 7-10 picături din soluţia apoasă de pirogalol 2%; coloraţia este aproape instantanee.

f. Spălarea în apă curgătoare.

g. Deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

h. **Rezultate**: nucleololema (componentă cromosomială) se colorează în albăstrui închis, aproape negru. Nucleolul se poate evidenţia şi prin alte metode de colorare nucleară (hematoxilina ferică Heidenheim).

3.1.4.4. Coloraţii citoplasmatice

Din punct de vedere tinctorial, citoplasma are afinitate pentru coloranţi acizi. Cei mai utilizaţi sunt: eozina în soluţie apoasă 1% (roz-cărămiziu), roşu Congo (virează în albăstrui în prezenţa acizilor) în soluţie apoasă 0,5%, fuxina acidă 1/200 în apă acetifiată 1%, ponceau R în soluţie apoasă 1% cu 1 ml acid acetic, verde lumină în soluţie apoasă 20,35 g% sau în soluţie alcoolică 0,82%.

1. *Punerea în evidenţă a mitocondriilor*

Fixatorii recomandaţi sunt amestecurile: Benoît, Flemming, Regaud,Helly.

Tehnica Benoît

a. Fixare în amestecul Benoît.........24-48 ore.
b. Spălare în apă curgătoare.............24 ore.
c. Postfixare în formol 10%.............24 ore.
d. Spălare în apă curgătoare.............24 ore.
e. Secţiunile de 2-3 microni, deparafinate, hidratate, sunt colorate la cald cu fuxina Altman.....5 min.
- fuxină acidă..................6g.
- apă anilinată saturată...100 ml.

f. Spălare energică şi rapidă în apă distilată.
g. Diferenţiere sub microscop cu o soluţie saturată de acid picric în alcool 96^0.
h. Oprirea diferenţierii printr-o spălare rapidă în alcool etilic 70^0.
i. Colorarea cu o soluţie apoasă de verde lumină 0,1-0,2%........3-5 min.
j. Deshidratare directă în alcool absolut.
k. Clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: mitocondriile apar colorate în roşu, citoplasma şi nucleii în verde, lipidele osmiofile în negru. Cu această tehnică se evidenţiază microvilii şi cilii vibratili din rinichi, intestin, trahee.
Rezultate bune se mai obţin prin utilizarea metodelor: Benda, Nassonov, impregnaţii argentice.

2. *Punerea în evidenţă a complexului Golgi. Tehnica Cajal-DaFano*

a. Fixare în amestecul preparat extemporaneu 3-24 ore.
- nitrat de cobalt.............1g.
- formol 40%...............15g.
- apă distilată...........100 ml.

b. Spălare rapidă în apă distilată.
c. Împregnare în soluţia NO_3Ag 1,5% la întuneric..........24-48 ore.
d. Spălare rapidă în apă distilată.
e. Reducere în amestecul........8-24 ore.
- hidrochinonă.......................2g.
- formol neutru 40%............15 ml.
- apă distilată....................85 ml.
- sulfit de Na anhidru.......0,1-0,5 g.

f. Spălare rapidă în apă distilată.
g. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
h. Secţiunile pot fi virate în Cl_2Au 1%......10-20 sec. şi fixate în tiosulfat de Na 1%......30 sec.
i. Spălarea în apă curentă..........2-5 min.
j. Supracolorare cu violet de crezil 1%..........1 min.
k. Diferenţiere în alcool 90^0 până la violet palid.
l. Deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: complexul Golgi apare sub forma unor filamente în reţea colorate în negru; fără supracolorare, citoplasma are o tentă aurie. Se obţin rezultate bune cu metoda Mann-Kopsch (cu tetraoxid de osmiu 1%), tehnica lui Elftman (cu azotat de argint).

3. *Punerea în evidenţă a R.E.G*

Toate tehnicile se bazează pe bazofilia acidului ribonucleic, constituientul carateristic al acestui organit. Cele mai bune rezultate se obţin prin detectarea histochimică.

a. Fixare fragmente scoarţă cerebrală în formol 10%.........24 ore.
b. Spălare apă curgătoare.......................................12-24ore.
c. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
d. Secţiuni de 4-5 microni, deparafinate şi hidratate.
c. Colorare cu soluţie apoasă de albastru de toluidină 10%.......10 min.
f. Spălare în apă distilată + 1 picătură dintr-o soluţie suprasaturată de carbonat de litiu.......5-10 sec.
g. Spălare în apă distilată...........2 min.
h. Diferenţiere pe stativ cu alcool etilic absolut 100 ml + 1 ml acid acetic + 1 pic. amoniac (până la obţinerea unei tente bleu-albastru).
i. Oprirea diferenţierii cu alcool etilic absolut, evitându-se decolorarea preparatului.
j. Clarificare, montare în balsam Canada.

Rezultate: corpusculii Nissl se colorează în bleu închis, citoplasma

în bleu deschis. Corpusculii Nissl mai pot fi evidenţiaţi cu soluţie apoasă 1% de thionină.

4. *Punerea în evidenţă a centrosomului. Coloraţia Flemming (varianta Matthey).*

a. Fixare în amestecul Flemming........24 ore.
b. Spălare în apă curentă până la dispariţia tentei galbene.
c. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
d. Secţiuni de 5-10 microni, deparafinate, hidratate.
e. Colorarea cu soluţie hidro-alcoolică de safranină........2,1/2 ore.
- sufranină.....................1g.
- alcool etilic absolut.....100ml.
- apă distilată................50ml.
f. Spălarea în 3 băi de apă distilată.
g. Tratarea cu soluţia.......5min.
- iodură de k..................2g.
- alcool etilic 70^0-80^0.....300ml.
- iod...........................1g.
h. Spălarea rapidă în apă distilată.
i. Colorarea cu soluţia apoasă 1% violet. cristal.....................15min.
j. Spălarea în apă distilată.
k. Tratarea cu soluţie iodurată alcoolică timp de ....20sec.
i. Deshidratare în 2 băi cu alcool etilic absolut...........10sec. fiecare.
m. Diferenţiere în esenţă de cuişoare saturată cu orange G.
n. Eliminarea excesului de diferenţiator prin xilol, montare în balsam de Canada.

Rezultate: citoplasma are o tentă galben-brună, diferenţierele fibrilare, centrosomul se colorează în brun închis.
Se mai utilizează cu bune rezultate metoda Hortega (impregnare cu argint amoniacal).

3.1.5. *Coloraţiile vitale*

3.1.5.1 Consideraţii generale

Coloraţia vitală reprezintă o metodă a cărei semnificaţie teoretică şi practică depăşeşte simpla punere în evidenţă a unor detalii de structură la nivelul ţesuturilor sau celulelor.

Importanţa acestei metode de studiu s-a impus încă de la primele încercări sistematice şi un număr mare de discipline biologice beneficiază

astăzi de rezultatele ei.

Punctul de plecare al acestei metode a fost punerea în evidenţă a anumitor ţesuturi, celule sau anumitor organite, evidenţiere obţinută prin administrarea la un animal viu, a unor coloranţi bine aleşi. Acest stadiu este depăşit însă de mult. În prezent, anumite coloraţii vitale sunt utilizate în scop pur morfologic dar interesul principal al metodei rezidă în explorarea permeabilităţii tisulare şi celulare, în analiza fenomenelor ce se derulează în timpul absorbţiei, transportului de substanţe în organism, a acumulării şi eliminării substanţelor introduse în mediul intern în scop experimental.

O coloraţie vitală este în realitate o experienţă de fiziologie celulară iar fiecare timp trebuie să fie atent supravegheat.

Coloraţiile vitale nu sunt metode de rutină, ele reprezintă metode de cercetare şi un procedeu de diagnostic.

În ceea ce priveşte definiţia acestei metode, deşi un număr mare de publicaţii şi cercetări au încercat să dea o definiţie satisfăcătoare coloraţiei vitale, nu s-a ajuns încă la un acord în acest sens.

Astfel Fischel (1910) propune desemnarea cu numele de coloraţii vitale, metodele ce permit obţinerea unei coloraţii a anumitor elemente citologice fără a sacrifica în prealabil animalul folosit ca material biologic de studiu.

Pentru Möllendorff (1920,1926) acest termen de coloraţie vitală este rezervat coloraţiilor obţinute în timpul vieţii animalului; în spiritul acestei definiţii, caloraţiile vitale sunt opusul coloraţiilor supravitale sau postvitale, executate pe ţesuturile unui organism ce tocmai a fost sacrificat ca şi în cazul coloratiilor ţesuturilor fixate.

Vonwiller şi apoi Gicklhorn încearcă definirea acestei metode, insistând asupra imposibilităţii trasării unei limite rigide între coloraţiile vitale şi postmortem printr-o definiţie riguroasă şi absolută.

În general deci, se foloseşte termenul de coloraţie vitală pentru toate coloraţiile executate pe elemente vii, obţinute administrând colorantul la animalul de experienţă în întregime, iar cel de coloraţie post-vitală pentru coloraţia aplicată ţesuturilor sau celulelor extrase din organismul viu deşi, se pare că această separare nu este justificată, cunoscut fiind faptul că viaţa celulelor nu încetează obligatoriu şi imediat ce sunt extrase din organism şi că ea poate continua un timp în condiţii de mediu favorabile iar colorarea anumitor structuri obţinute în condiţii "vitale" pot reprezenta, la nivel celular, un fenomen post-mortem.

Numărul coloranţilor este mare, tehnica variind în funcţie de colorant şi animalul de experienţă. De exemplu, pentru studiul celulei în general se

folosesc coloraţiile vitale cu roşu neutru, verde Janus, albastru de metilen. Interpretarea coloraţiilor vitale şi explicarea mecanismelor de acţiune ale acestora sunt probleme cu grad sporit de dificultate. Problemele de ordin fizico-chimic pe care le pune coloraţia vitală a celulelor şi organitelor sunt departe de a fi soluţionate. Ar fi iluzoriu să considerăm, în momentul de faţă, având în vedere stadiul actual al cunoştinţelor din acest domeniu, că se poate forma o teorie unică ce ar permite interpretarea coloraţiei tuturor structurilor de către toţi coloranţii vitali.

Este sigur însă că mecanismele ce intervin în fenomenul global al colorării în vivo, al diverselor structuri, sunt numeroase şi variate.

3.1.5.2. Clasificarea coloranţilor vitali

În mod clasic se disting coloranţi vitali acizi şi bazici dar această clasificare nu include şi substanţele din familia Sudan care pot fi considerate coloranţi vitali ai lipidelor întrucât administrarea lor prin ingestie sau prin injectare permite obţinerea colorării tuturor incluziunilor lipidice a căror punct de topire este inferior temperaturii corpului.
Deci în afara acestor compuşi, în general grupaţi în categoria "alţi coloranţi", principalii coloranţi vitali pot fi clasificaţi în:

1. *coloranţi acizi*: alizarina, roşul Congo, albastru pirol, albastru tripan, cerneală de China, carminatul de amoniu, nu sunt coloranţi în sensul propriu al cuvântului dar sunt incluşi în această categorie deoarece ei sunt utilizaţi pentru evidenţierea elementelor histiocitare.

2. *coloranţi bazici*: albastru de metilen, albastru de toluidină şi azurul de metilen ce sunt tiozine, roşu neutru şi verde Janus ce sunt azine, violetul de cresil, albastru de Nil, - oxazine, etc.

3.1.5.3. Etapele coloraţiei vitale

Lui Möllendorff îi revine meritul de a fi insistat primul asupra importanţei pe care o reprezintă studiul coloraţiilor vitale în funcţie de timp. Acest autor defineşte trei stadii succesive ale unei coloraţii vitale: absorbţia, repartiţia intracelulară şi acumularea electivă a colorantului.

Este vorba de trei fenomene a căror delimitare nu este absolută; fiecare având reguli diferite de definiţie fiind condiţionat de factori diferiţi. De aici şi interesul major pentru delimitarea acestor trei stadii în momentul descrierii coloraţiilor vitale.

Într-o lucrare a lui Gicklhorn sunt analizate aceste trei stadii ale unei

coloraţii vitale, evidenţiindu-se faptul că pătrunderea unui colorant vital în interiorul celulelor depinde de permeabilitatea normală sau modificată a plasmalemei avute în vedere ca şi de capacitatea celulei de a fixa colorantul respectiv. Repartiţia colorantului în interiorul organismului viu face să apară problema specificităţii la nivel celular, tisular sau al întregului organism.

În ceea ce priveşte acumularea colorantului, aceasta depinde de structura şi compoziţia chimică a celulelor şi ţesuturilor. Acumularea colorantului vital sub formă granulară reprezintă modalitatea cea mai frecventă. Această acumulare se face în mod diferit în cazul coloranţilor bazici faţă de coloranţii acizi.

Coloranţii bazici se acumulează înainte de toate la nivelul formaţiunilor preexistente, adică organite celulare sau paraplasmă.

Dimpotrivă, coloranţii acizi se acumulează în granule sau vacuole care se formează în momentul acestei acumulări. Această regulă formulată de Mollendorff este valabilă şi astăzi în linii mari. În ceea ce priveşte mecanismul acumulării este vorba, după opinia aceluiaşi cercetător de o floculaţie, intervenind şi unele fenomene electrostatice.

3.1.5.4. Particularităţile fizico-chimice ale soluţiilor coloranţilor vitali

Cercetările efectuate de Mollendorff au arătat că formula de structură a colorantului vital ar avea mult mai puţină importanţă decât particularităţile fizico-chimice ale soluţiei utilizate. Această concluzie este valabilă mai ales în cazul coloraţiei vitale în care se folosesc coloranţi acizi .

Natura chimică a colorantului utilizat nu reprezintă decât unul din factorii din ansamblul celor ce determină proprietăţile soluţiei administrate animalului de experienţă. Mărimea particulelor, încărcarea lor electrică, pH-ul, presiunea osmotică, vâscozitatea, constanta dielectrică a mediului, prezenţa coloizilor şi altor factori, intervin în mod esenţial în determinarea caracterelor fizico-chimice a acestor soluţii iar rezultatul coloraţiei vitale depinde în mare măsură de acestea.

Este deci necesară întotdeauna, ca odată cu prezentarea rezultatelor unor coloraţii vitale să fie precizate şi caracterele fizico-chimice ale soluţiilor utilizate în cursul experienţelor.

3.1.5.5. Reguli generale de aplicare ale coloranţilor vitali

Modul de aplicare al coloranţilor vitali variază într-o mare măsură în funcţie de structurile ce se doresc a fi evidenţiate şi de funcţia pe care se doreşte a o explora.

Scanned with OKEN Scanner

1. *Folosirea coloranţilor acizi*
Anumiţi coloranţi acizi pot fi administraţi pe cale orală aşa cum este albastrul de tripan. Rezultatele nu sunt totuşi satisfăcătoare decât la unele nevertebrate.

Injectarea colorantului în mediu intern al animalului de experienţă rămâne metoda cea mai indicată. La vertebrate, această injectare poate fi făcută subcutanat, intraperitoneal sau intravenos.

Se observă în acest caz, coloraţii "locale" sau "de vecinătate" (ţesut conjunctiv vecin locului de injectare subcutanat, epiplon în caz de injectare intraperitoneală, elemente histiocitare ale ficatului, splinei, măduvei osoase în caz de injectare intravenoasă). Acumularea electivă a colorantului în anumite ţesuturi sau organe este precedată de prezenţa difuză în tot organismul animalului de experienţă.

Viteza de apariţie a colorării unui organ dat depinde de calea de administrare; administrarea intravenoasă duce la repartizarea cea mai omogenă a colorantului în corpul animalului de experienţă şi la acumularea cea mai rapidă în organe.

Inconvenientul major al acestei căi de administrare constă în toxicitatea majorităţii soluţiilor coloranţilor vitali, toxicitate ce imprimă o reducere sensibilă a dozei ce va fi administrată pe cale intravenoasă. Soluţiile trebuie preparate proaspăt deoarece marea majoritate a soluţiilor de coloranţi vitali capătă pe măsura trecerii timpului (chiar în cazul conservării în condiţii aseptice şi la temperaturi scăzute) o toxicitate a cărei origine este încă necunoscută.

Examinarea ţesuturilor şi celulelor colorate prin intermediul unui colorant vital acid poate fi făcută în stare proaspătă sau după o fixare.

Contrar coloranţilor bazici, acumularea coloranţilor vitali acizi poate fi conservată prin folosirea unei serii de agenţi fixatori chimici, aceasta putând duce la erori de interpretare. De aceea modalitatea ideală este de a examina in vivo şi in situ celulele sau ţesuturile ce conţin acumulări de coloranţi acizi.

Acest lucru este uşor de realizat pentru unele ţesuturi şi organe (mezenter, plămân, cornee), posibil în alte situaţii (ex. rinichi de soarece) şi imposibil de realizat în majoritatea cazurilor, astfel încât realizarea secţiunilor la congelare şi de material proaspăt este de maximă importanţă pentru examinarea rezultatelor coloranţilor vitali.

Alegerea fixatorului, prelucrarea ulterioară a pieselor şi alegerea coloraţiilor de fond depinde de colorantul vital utilizat şi de ţesut.

2. *Folosirea coloranţilor bazici*. Condiţiile de aplicare şi mai ales

tehnica examinării sunt particulare în cazul coloranţilor vitali bazici. Conservarea prin fixatori chimici este imposibilă în majoritatea cazurilor şi de aceea este necesară urmărirea in vivo a tuturor fazelor coloraţiei.

Anumiţi coloranţi, ex: verdele Janus, nu sunt utilizaţi decât pentru aplicări locale; alţii, ca roşu neutru sau albastru de metilen pot fi aplicaţi local sau injectaţi în mediul intern al animalului de experienţă. Modalităţile şi precauţiile de preparare semnalată pentru coloranţii vitali acizi sunt valabile şi în cazul coloranţilor bazici.

3.1.5.6. Colorare vitală a mitocondriilor — fără.

a. Se face o soluţie apoasă de albastru de metilen 1%.
b. Se incălzeşte la temperatura corpului.
c. Se injectează în vena cozii la soarece 0,5 - 1 ml. din soluţia 1% de albastru de metilen la temperatura de 25^0-27^0C.
d. După 24 ore se sacrifică animalul şi fragmentele de rinichi se fixează 4-6 ore în amestecul:
- soluţie apoasă saturată acid picric.....60ml.
- formol 40%..............................20ml.
- soluţie apoasă saturată molibdat amoniu.......20ml.

e. Spălare în apă curgătoare...................12-24ore.
f. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
g. Secţiunile de 3-5 microni deparafinate şi hidratate se colorează cu safranină pentru nuclei.
h. Spălare în apă distilată.
i. Deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: glomerulii apar incolori iar mitocondriile din nefrocite se colorează în albastru.

IV. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA ELECTRONICĂ.

Biologia celulară şi moleculară, ca ştiinţă de sine stătătoare, a luat naştere în urmă cu aproximativ 50 de ani ca urmare a utilizării complexe a trei metodologii:

- microscopia electronică;
- fracţionarea celulară;
- culturile de celule;

Dintre acestea, microscopia electronică domina perioada contemporană a microscopiei deoarece este singura metodologie care poate furniza informaţii directe asupra organizării lumii vii în domeniul dimensiunilor de 1,2 Å-2000 Å, care scapă posibilităţii de studiu cu microscopul fotonic.

4.1. TIPURI DE INFORMAŢII CARE SE POT OBŢINE PRIN MICROSCOPIE ELECTRONICĂ

- gradul de înrudire genetică dintre organisme;
- biosinteza de proteine şi structurile implicate în acest proces;
- structura şi configuraţia macromoleculelor proteice;
- configuraţia moleculară a acizilor nucleici şi stabilirea greutăţii lor moleculare;
- procese de filtrare prin membrană;
- transportul ionic în celule;
- localizarea reacţiilor imunologice şi a activităţii enzimatice;
- acţiunea unor substanţe asupra structurilor celulare (ex: chimioterapice, pesticide, etc.);
- structura supfeţelor ţesuturilor, celulelor şi biomoleculelor;
- alcătuirea moleculară a virusurilor şi mecanismele infecţiei virale;
- procese de transcripţie şi translaţie în codul genetic;
- ultrastructura diferitelor tipuri de celule şi a componentelor acestora în stare normală şi patologică, etc.

4.2. PRELEVAREA PROBELOR

Pentru a preveni schimbările de orice natură care pot apare la nivel tisular sau celular chiar din momentul prelevării, recoltarea trebuie să se facă

rapid (la câteva minute de la întreruperea circulaţiei sanguine, apar modificări semnificative în ultrastructura complexului Golgi, mitocondriei şi reticulului endoplasmic). Este necesar să se ia în considerare şi particularităţile tipului de organism, organ sau ţesut supus studiului, chiar dacă în unele cazuri anumiţi parametrii funcţionali ai ţesuturilor nu sunt influenţaţi sau chiar dacă alterarea se produce în ritm lent.

Condiţia esenţială obţinerii unor rezultate corecte este ca probele de material biologic să fie prelevate numai din organisme vii care nu au suferit acţiunea unor factori stresanţi sau din culturi celulare proaspete şi direct din mediul în care au crescut. Bune rezultate se obţin când concomitent cu prelevarea pieselor de ţesut se realizează şi o prefixare a materialului respectiv.

1. Fragmentele de material biologic obţinute prin puncţii sau biopsii, sau fragmentele mici din ţesuturile şi organele recoltate imediat după sacrificarea animalului de experienţă sunt puse pe faţa fără emulsie da azotat de argint a unei hârtii fotografice.

2. Peste aceste fragmente se pun 2-3 picături din lichidul fixator ($+4^0$C) pentru a opri pe cât posibil acţiunea distructivă a enzimelor celulare.

3. Cu ajutorul a două lame de ras noi, bine degresate, prin mişcări de translaţie se confecţionează cubuleţe cu latura de 1mm.

4. Cu o scobitoare se ridică fragmentele şi se introduc într-un flacon cu fixator răcit la $+4^0$C. Sângele se recoltează pe anticoagulant (acid citric şi dextroză).

4.3. FIXAREA

Fixarea în microscopia electronică ca şi în cea fotonică are drept scop conservarea structurilor biologice cât mai aproape de starea lor funcţională vie. De asemeni, prin fixare, celulele capătă un oarecare grad de rezistenţă împotriva eventualelor distrugeri ce pot surveni în cursul operaţiunilor ulterioare. Tipul de fixator, procedeul folosit la fixare şi durata diferitelor etape ale procesului de fixare depind nu numai de materialul biologic ci şi de scopul urmărit în cadrul studiului întreprins.

Pentru fixare se folosesc:

1. *Metode fizice* - au la bază folosirea temperaturilor foarte scăzute, cu sau fără infiltrarea prealabilă a ţesuturilor cu agenţi de crioprotecţie, pentru a preveni formarea cristalelor de gheaţă ce ar putea deteriora structurile biologice. În ultimii ani se folosesc: deshidratarea inertă şi metoda de substituţie prin îngheţare.

2. *Metode chimice* - folosesc proprietăţile fixatoare ale unor reactivi care blochează rapid metabolismul celular, inclusiv activităţile enzimatice.

Soluţia fixatoare este formată din: a) soluţia tampon; b) agentul fixator

a) soluţiile tampon au rolul de a asigura molaritatea necesară diferitelor formule de fixare şi de a crea mediul de reacţie adecvat acţiunii acestora asupra materialului biologic. Se folosesc şi în diferite studii de ultracitochimie.

Dintre soluţiile tampon mai folosite sunt:

- tampon cacodilat (compatibil cu toţi agenţii fixatori)

- tampon fosfat (compatibil cu toţi agenţii fixatori, incompatibil cu ionii de calciu şi uranil)

- tampon veronal (utilizat de Palade în 1952 pentru a tampona OsO_4, este incompatibil cu aldehide fixatoare)

b) agenţii fixatori: **anorganici** (oxizi - OsO_4, săruri-permanganat de potasiu şi bicromatul de potasiu); **organici** (aldehidele-formaldehidele, glutaraldehida, acroleina, acizi-acidul tanic şi unele catechine).

Aldehidele sunt foarte buni fixatori realizând o excelentă conservare a structurilor celulare şi a activităţii enzimatice; sunt folosite ca prefixatori la aproape toate categoriile de ţesuturi, acţiunea lor fixatoare bazându-se pe procese reducătoare. Fixarea poate fi simplă, dublă (doi fixatori aplicaţi în etape succesive), triplă, combinată (acţiunea simultană a amestecului de doi sau mai mulţi fixatori prin reacţii concomitente de reducere şi oxidare asupra ţesutului).

În practica curentă se foloseşte o **dublă fixare**:

- **prefixare** cu glutaraldehidă tamponată;
- **postfixare** cu tetraoxid de osmiu tamponat;

Se utilizează trei procedee de fixare:

a) *Fixarea prin imersie*- fragmentele recoltate se introduc în flaconul cu fixator aflat într-un vas cu gheaţă (fixare postvitală)

b) *Fixarea prin sedimentare*- se realizează în tuburi de centrifugă, în cazul preparatelor care necesită sedimentar pe parcursul lucrărilor; suspensiile conţin material biologic ce sedimentează, supernatantul se aruncă iar peste depozit se pun câţiva ml de fixator, se agită energic, apoi după expirarea timpului de fixare, soluţia fixatoare se înlătură prin centrifugare şi sedimentul este prelucrat în continuare.

c) *Fixarea prin perfuzie*- se realizează prin introducerea lichidului fixator în torentul circulator, înaintea sacrificării animalului de experienţă.

Tehnica de lucru.

Scanned with OKEN Scanner

Fragmentele prelevate şi fasonate sunt introduse cu ajutorul unei scobitori într-un flaconaş în care se găseşte glutaraldehidă tamponată (+4^{0}C) în care vor sta 1 oră la frigider; flaconul se acoperă cu un dop (glutaraldehida este toxică) pe care se notează numărul de ordine din registrul de evidenţă.

În laboratorul nostru utilizăm fixatorul 251 format din:
- glutaraldehidă distilată 10%.................2 părţi
- tampon fosfat 0,1 M.........................5 părţi
- apă bidistilată.................................1parte

Fixatorul se varsă într-o sticlă cu dop rodat iar fragmentele rămase pe pereţii flaconului se spală de trei ori a câte 1 oră cu tampon fosfat 0,15 M la temperatura de 4^{0}C.

După a treia spălare fragmentele sunt post-fixate în acelaşi flacon cu fixatorul Milloning timp de 1 oră şi la +4^{0}C.
- tetraoxidul de osmiu........................1g
- tampon fosfat, 0,15 M......................100ml

Acest fixator poate fi utilizat 1-2 săptămâni de la data preparării, ţinut în sticle brune cu dop rodat (este foarte toxic) şi la frigider (+4^{0}C).

4.4. SPĂLAREA PIESELOR

Are drept scop oprirea procesului de fixare şi îndepărtarea excesului de fixator. Cel mai recomadat procedeu este acela de a spăla ţesuturile timp de 5-20 min sau chiar peste noapte cu aceeşi soluţie tampon care a fost folosită la prepararea fixatorului.

4.5. DESHIDRATAREA PREPARATELOR

Prin deshidratarea preparatelor se urmăreşte eliminarea apei din ţesuturile fixate pe cale chimică sau fizică fără a produce modificări in structura moleculară nativă a celulelor din ţesuturi.

Alegerea solventului pentru deshidratare este în funcţie de materialul de includere, acesta trebuie să fie miscibil cu agentul de deshidratare. În cazul folosirii vestopalului ca material de includere se foloseşte acetona iar în cazul eponului alcoolul etilic şi propilenoxidul.

4.6. INCLUDEREA

Includerea este etapa în care piesele deshidratate corect se introduc

într-un mediu lichid care, prin polimerizare, trece în stare solidă. Calităţile necesare mediului de includere sunt:

- să fie solubil în agenţii de deshidratare;
- să aibă molecula mică şi vâscozitate redusă pentru a putea pătrunde uşor în ţesuturi;
- să fie transparent pentru a putea permite centrarea piesei şi fasonarea blocurilor în vederea secţionării;
- să facă masă compactă cu tesutul în urma polimerizării;
- să se polimerizeze uşor, liniar, fără modificări de volum;
- să permită obţinerea de blocuri de diferite durităţi şi să se secţioneze uşor;
- să aibă stabilitate mecanică la bombardamentul cu electroni (densitate mică, putere mică de împrăştiere a electronilor, asigurând un contrast înalt ţesutului pe care îl impregnează);
- să nu prezinte factori de risc, adică să nu fie toxice sau toxicitate limitată.

Cele mai utilizate medii de includere fac parte din grupa răşinilor poliesterice (vestopal) a răşinilor epoxidice (epon 812, epon 562, araldita) şi mediile de includere hidrofile (durcopanul, hidroxipropilmetacrilatul) care prezintă avantajul că evită deshidratarea şi conservă lichidele şi enzimele din celulă.

Includerea se face în capsule de gelatină sau polietilenă (BEEM).

Capsulele de gelatină trebuie să fie:

a) transparente pentru a vedea poziţia piesei în răşină şi pentru a-i da orientarea dorită;

b) de dimensiuni potrivite, pentru a permite o polimerizare uşoară a monomerilor;

c) bine uscate, ceea ce se realizează prin ţinerea lor înainte de a fi umplute cu răşină în termostat la 60^0C pentru câteva ore.

Capsulele de polietilenă se folosesc la includerea structurilor biologice aflate în depozite după centrifugare (virusuri, microorganisme, fracţiuni celulare) sau chiar a structurilor compacte. Blocurile solidificate obţinute în aceste capsule sunt gata fasonate pentru secţionare.

Capsulele de gelatină se aşează în poziţie verticală în suporturi de plastic sau carton; pe marginea lor se introduce cu o pipetă o picătură de epon sau vestopal de lucru, avitându-se formarea bulelor de aer. Cu ajutorul unei scobitori în fiecare capsulă se plasează un singur cubuleţ de ţesut sau organ care se aşează central; se introduce eticheta cu numărul cazului, se umple capsula cu epon sau vestopal de lucru şi se lasă sub nişă până a doua

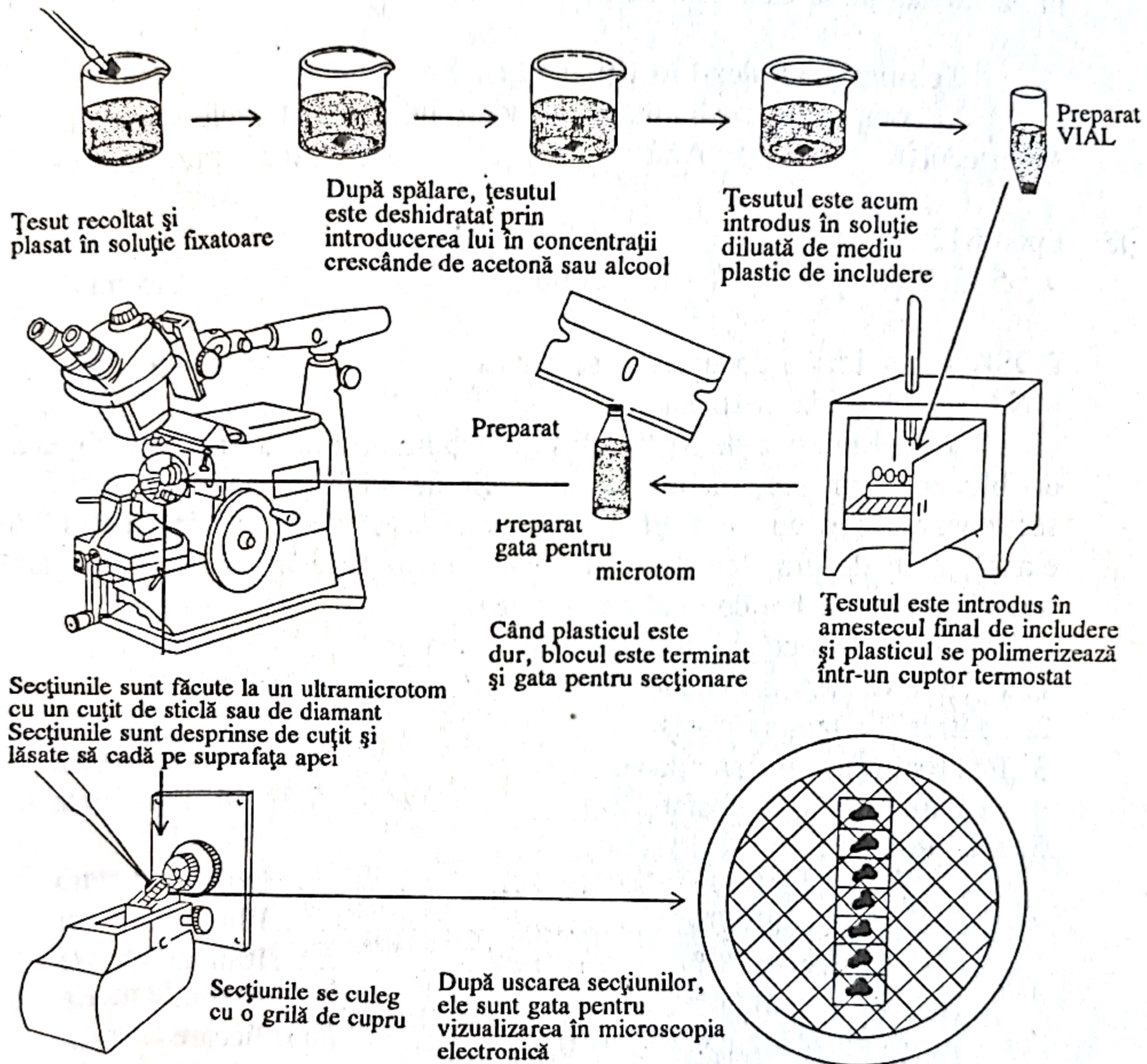


Fig.24. Reprezentarea schematică a derulării etapelor de prelucrare a materialelor biologice în vederea examenului lor la TEM.

Scanned with OKEN Scanner

zi dimineaţă.

Suportul cu capsule este introdus apoi într-un termostat la 60⁰C unde, în 24-48 ore se face polimerizarea materialului de includere. La sfârşitul polimerizării blocul trebuie să fie transparent, suficient de dur şi să conţină în vârful său piesa care este de culoare neagră.

Tehnica includerii în Epon 812

În compoziţia mediului de includere intră următoarele substanţe:

Amestecul A	+	Amestecul B	+	Accelerator DMP - 30
Epon 812 +DDSA 5 ml		Epon 812+MNA 5 ml		0,15 ml

DDSA = anhidrida dodecenil - succinică
MNA = anhidrida metilanadică

Acest amestec de 5 : 5 folosit în laboratorul nostru permite obţierea de blocuri uşor secţionabile cu un cuţit de sticlă. Amestecul 3 : 7 se secţionează bine cu un cuţit de diamant. Acest amestec fiind solubil în etanol, oxid de propilen deshidratarea se poate face în etanol cu sau fără intercalarea unor băi de oxid de propilen.

Procedeul ce trebuie urmat este următorul:

1. Fixarea în G.A.tamponată
2. Spălarea în tampon fosfat
3. Postfixare în O_sO_3 tamponat
4. Spălare în tampon fosfat
5. Deshidratare:

alcool 30%..............................10min.
alcool 50%..............................10min.
alcool 70%..............................10min.
alcool 90%..............................10min.
alcool 100% (2 băi) ....20 min. fiecare
acetonă 100% (2 băi) ....20 min. fiecare

(acestă ultimă etapă nu este obligatorie, dar se recomandă pentru o mai bună impregnare)

6. Impregnare

acetonă 100% + epon de lucru 1/1 ....1 oră
epon de lucru 1oră

7. Includere: piesele din materialul biologic se introduc în capsule de gelatină în eponul de lucru, în nişă, la temperatura laboratorului.

8. Polimerizarea eponului la termostat, la 60^{0}C.

Ţesuturile se pun în capsule de gelatină cu amestec de Epon proaspăt preparat. Se lasă până când piesele cad la fundul capsulelor şi apoi polimerizarea are loc la 60^{0}C peste noapte.

4.7. SECŢIONAREA

Preparatele boilogice fixate şi incluse în diferite medii de includere sunt supuse unor operaţii de secţionare prin tehnici speciale, cu ajutorul unor aparate speciale numite ultramicrotoame, pentru a realiza secţiuni ultrafine, a căror grosime nu depăşeşte 1000 Å şi care vor fi uşor traversate de fasciculul de electroni.

Apărută după 1948, ultramicrotomia se dezvoltă în paralel cu celelalte tehnici de microscopie electronică şi constituie un domeniu aparte, cu o aparatură şi o metodologie proprie.

Tehnicile de ultramicrotomie se caracterizează printr-o mare fineţe cu ajutorul lor putându-se realiza 20-30 secţiuni ce nu sunt vizibile cu ochiul liber, printr-o celulă cu diametrul de 1 μm, de exemplu o bacterie.

4.7.1. *Tipuri de ultramicrotoame*

În prezent există două tipuri de ultramicrotoame ce se deosebesc prin principiul folosit la înaintarea preparatului către cuţit în timpul procesului de secţionare. Se cunosc astfel: microtoame cu avans mecanic şi microtoame care funcţionează pe principiul avansului prin expansiune termică.

Din punct de vedere al construcţiei, orice microtom este alcătuit dintr-un bloc metalic pe care sunt fixate tija de care se fixează preparatul şi mecanismul de avans al acesteia, suportul pentru cuţit, microscopul stereoscopic necesar observării proceselor secţionării şi reglării aparatului şi sistemul de iluminare. Acestea alcătuiesc ultramicrotomul propriu-zis. Separat se află blocul electronic de control. Ultramicrotomul şi blocul electronic de control sunt fixate pe o masă proprie, prevăzută cu sisteme de prevenire şi amortizare a vibraţiilor.

a) Ultramicrotoamele cu expansiune mecanică.

- cu mod de operare manual (Sorvall Porter-Blum Mt1, Cambridge - Huxley) se aseamănă cu microtoamele clasice, avansul preparatului către cuţit făcându-se prin intermediul unor roţi dinţate în urma rotirii cu mâna a unei roţi de avans prevăzută cu manivelă.

b) Microtoamele cu expansiune termică.

Scanned with OKEN Scanner

- cu mod de operare manual, semiautomat şi automat (L. K. B., Reichert O_mU_3) funcţionează pe baza pricipiului de dilatare termică. Tija metalică (care serveşte drept suport pentru blocul ce trebuie secţionat) fixată cu una din extremităţi de un cadru, are înfăşurată pe ea o bobină; la trecerea unui curent electric de intensitate variabilă, tija metalică se încălzeşte, se dilată şi transmite dilatarea ei numai la extremitatea liberă, determinând înaintarea către cuţit a preparatului. Concomitent cu deplasarea orizontală, tija descrie şi o mişcare în plan vertical de sus în jos.

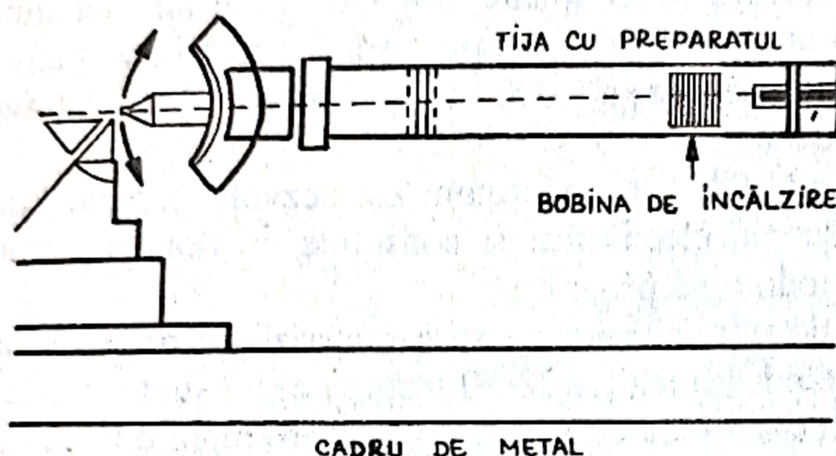


Fig.25. Dispozitivul de secţionare al ultramicrotoamelor cu expansiune termică.

4.7.2. *Cuţite pentru ultramicrotoame*

În perioada de început a ultramicrotomiei pentru a realiza secţiuni ultrafine s-au folosit cuţite de oţel, fiind adaptate în acest scop lame de ras; pentru ca acestea să corespundă exigenţelor unui cuţit de ultramicrotom, primele ultramicrotoame erau înzestrate şi cu dispozitive de ascuţire a lamelor.

a) Cuţitele de sticlă - au fost introduse pentru prima dată în 1950 în urma cercetărilor lui Latta şi Hartman (1950).
Calitatea sticlei este de asemenea importantă; sticla cu grosimea de 5-8 mm, folosită la confecţionarea oglinzilor de culoare albă şi nu verzuie, atunci când este tăiată în benzi şi care este lipsită de tensiuni interne pare să fie cea mai bună. Există şi sticlă specială trasă în benzi pentru ultramicrotoame produsă de o firmă belgiană de unde este procurată de firma suedeză LKB şi livrată odată cu ultramicrotoamele LKB.

Confecţionarea cuţitelor se poate face fie manual, fie cu ajutorul unui aparat special (ex: aparatul Reichert - TAAB Knife Maker).

Cuţitele confecţionate manual sau cu ajutorul aparatului trebuie

selecţionate după calitatea lor. Alegerea se face cu ochiul liber şi la microscop, tăişul cuţitului trebuie să fie drept.

Operaţiei de confecţionare a cuţitelor şi de selectare a acestora trebuie să i se acorde cea mai mare importanţă, deoarece cuţitele cu defecte vor imprima secţiunilor neregularităţi, nepermiţând obţinerea de secţiuni sub formă de panglică.

Cuţitele se păstrează în cutii speciale, în poziţie verticală sau în plăci Petri pe un pat de vată, pentru a le feri de praf. Înainte de folosire, la cuţit se ataşează o mică băiţă pentru colectarea secţiunilor pe suprafaţa apei. În acest scop se pot folosi băiţe de metal, gata confecţionate (ex: cele furnizate de LKB) sau pot fi confecţionate în laborator.

b) Cuţitele de diamant - au fost introduse în 1953. Ele pot fi folosite o perioadă lungă de timp şi dau posibilitatea secţionării materialelor de cele mai diferite durităţi.

Se cunosc două tipuri de cuţite de diamant: standard şi special. Tipurile standard se folosesc la secţionarea materialelor incluse în metacrilaţi, Vestopal, iar tipul special la secţionarea materialelor incluse în răşini epoxidice.

Tăişul cuţitelor de diamant este casant, se poate uşor contamina cu particule din aer sau coroda în contact cu umiditatea, de aceea ele trebuie păstrate în cutia originală, ferite de praf.

4.7.3. *Fasonarea blocurilor*

Înainte de a le supune procesului de secţionare, blocurile cu preparate biologice trebuie fasonate.

Prin această operaţie o anumită zonă din preparat capătă aspect de piramidă. Dacă la includere s-au folosit capsule de polietilenă, atunci blocul apare aproape gata fasonat în această formă.

Operaţia de fasonare a blocurilor se face manual după îndepărtarea capsulei de gelatină, sub o lupă binoculară, cu ajutorul unei lame de ras noi, după fixarea blocului într-un portbloc.

Se confecţionează un trunchi de piramidă, al cărui vârf trunchiat ce conţine piesa, trebuie să aibă forma unui pătrat cu latura de 0,1-0,2 mm.

Fasonarea blocului se poate face cu ajutorul ultramicrotomului şi cu cuţite de sticlă.

O metodă simplă a fost preconizată în acest scop de Galley (1963) fiind eliminate pierderile de ţesut care pot apărea la fasonarea manuală.

Există şi aparate speciale pentru fasonarea blocurilor numite

Scanned with OKEN Scanner

piramitoame asemănătoare microtoamelor clasice (ex: piramitomul LKB1 1800 şi piramitomul Reichert TM 60). Ambele instrumente realizează în 1-2 minute piramide de calitate, prin numai 4 secţiuni.

Indiferent de metoda de fasonare, piramida trebuie să fie foarte mică, să aibă laturile netede, deoarece numai din blocurile astfel fasonate se poate obţine o panglică de secţiuni.

4.7.4. *Secţionarea propriu-zisă şi colectarea secţiunilor*

Înaintea secţionării propriu-zise, port-preparatul se fixează în partea terminală a tijei de avans iar cuţitul se montează în suportul său şi, folosind sistemele de ghidare, se urmăreşte ca faţa cuţitului care "priveşte" spre preparat să fie alipită de ghidajul perpendicular al cuţitului.

- Cuţitul se orientează astfel încât tăişul lui să fie paralel cu suprafaţa preparatului iar suportul cu preparatul se roteşte încât laturile care delimitează pătratul sau trapezul să fie perpendiculare pe gura cuţitului iar baza mare a trapezului să fie paralelă cu tăişul acestuia.

Toate aceste reglaje se execută privind prin microscopul stereoscopic.

- Cu ajutorul unei seringi se introduce în băiţa cuţitului o soluţie de acetonă sau alcool 10-15%, în cazul cuţitelor de sticlă sau, apă distilată în cazul cuţitelor de diamant şi se urmăreşte sub microscop până când lichidul atinge tăişul cuţitului. Prin mişcarea lămpii fluorescente înainte şi înapoi se urmăreşte reflexia luminii pe suprafaţa apei din băiţă, reprezentată printr-o pată albă care trebuie să se întindă pe toată lungimea cuţitului.

- Privind prin microscop tăişul cuţitului şi piramida din preparat, centrate în acelaşi câmp vizual, se aduce cuţitul cu ajutorul vizei macrometrice, foarte aproape de preparat şi apoi se trece aparatul pe controlul automat. După o serie de mişcări în gol, preparatul va atinge cuţitul şi va începe secţionarea.

- Grosimea secţiunilor poate fi reglată electronic de la pupitrul de control în limitele dorite.

Vizual, grosimea secţiunilor se poate aprecia prin reflexia în băiţă pe suprafaţa apei, culoarea secţiunilor în lumină reflectată fiind în funcţie de grosimea acestora (Peachey 1958, Zelander şi Ekholm 1960).

Culoare	Grosime (Å)
cenuşie	sub 600
argintie	600 - 900
aurie	900 - 1500
purpurie	1500 - 1900

albastră	1900 - 2400
verde	2400 - 2800
galbenă	2800 - 3200

Pentru cercetările de rutină secţiunile de culoare argintie se consideră convenabile. Pentru cercetările de microanaliză cu ajutorul dispozitivului EDAX ataşat la microscop ca şi pentru estimarea densităţii numerice a ribozomilor în celule, au fost imaginate tehnici noi de determinare a grosimii secţiunilor (Chander 1976; Gunning şi Hardham 1977).

Obţinerea unor secţiuni ultrafine de bună calitate depinde în primul rând de modul de fasonare al blocului în special de dimensiunile vârfului şi forma planului de tăiere, de existenţa unui cuţit curat, de nivelul apei la gura cuţitului şi de unghiul de înclinare al cuţitului.

Mai trebuie avute în vedere alegerea unei viteze de secţionare mici şi evitarea atingerii preparatului în timpul lucrului.

Secţiunile semifine se fac cu ajutorul ultramicrotomului prin folosirea avansului manual (cu o grosime de 1500-3200 Å) cu scopul de a verifica dacă blocul respectiv conţine elementele pe care ni le-am propus să le examinăm.

Secţiunile semifine se culeg din bac cu o ansă de sârmă subţire şi se aşează pe o lamă portobiect degresată; apa este înlăturată prin încălzirea lamei la flacără care realizează şi aderenţa secţiunilor pe lamă.

După colorare se analizează la microscopul fotonic. Pentru colorarea secţiunilor semifine există mai multe metode: colorarea cu albastru de toluidină (Trump şi colab. 1961), cu albastru de anilină - albastru de metilen, cu Azur II, cu fuxină bazică - albastru de metilen, etc. Aproape toate aceste metode permit obţinerea unui contrast înalt şi observarea cu uşurinţă a detaliilor celulare. Alegerea uneia sau alteia dintre metodele menţionate depinde de ţesutul ce urmează să fie cercetat, de mediul în care este inclus. În laboratorul nostru se utilizează colorarea cu o soluţie de albastru de toluidină 0,1% şi soluţie carbonat de sodiu 2,5% în părţi egale, pH 11.

Colorarea se face aplicând pe lamă 2-3 picături din soluţia de albastru de toluidină; lamele se pun în termostat la 60 grade C timp de 10-30 min. apoi se spală în apă curgătoare apoi în acetonă 100%, se trec rapid prin xilol, se sugativează, se montează şi se examinează la microscopul fotonic.

Secţiunile ultrafine rezultate în urma secţionării urmează să fie depuse pe un portobiect care în microscopia electronică este o grilă metalică. În acest scop se opreşte aparatul şi panglica se fragmentează cu ajutorul unui fir de păr prins de un beţişor. Cel mai indicat pentru acestă operaţie este un

fir de păr de geană, care, în urma lipirii pe beţişor, trebuie să aibă liberă partea cu bulbul, de care nu aderă secţiunile. Încercarea de a mişca secţiunile cu alte mijloace, de ex. cu un ac, poate duce la pierderea lor, deoarece acestea se prind foarte uşor de orice material.

Secţiunile se grupează în şiruri paralele pentru a putea fi depuse pe grilă în număr cât mai mare. Dacă dorim reconstituirea tridimensională a structurilor cercetate, atunci secţiunile trebuie să fie colectate bucată cu bucată şi numerotate.

4.8. APLICAREA SECŢIUNILOR ULTRAFINE PE GRILE

4.8.1. *Grile suport*

Preparatele biologice folosite în microscopia electronică fiind extrem de fine, nu au rigiditate mecanică. De aceea ele se plasează pe un portobiect corespunzător. Dacă în microscopia fotonică se folosesc ca portobiect lame de sticlă, în microscopia electronică de transmisie portobiectul este o grilă metalică şi o peliculă de natură organică sau anorganică ce acoperă suprafaţa grilei.

La început s-au folosit ca suport pentru preparat discuri sau şaibe de metal confecţionate din aliaj de aur sau platină. Apoi acestea au fost înlocuite cu grile metalice obţinute prin ştanţare din plase sau reţele de cupru, bronz fosforos sau nichel cu 50-150 ochiuri/cm^2. După 1950 s-a trecut la folosirea grilelor produse pe cale electrolitică sau prin metode fotolitografice.

În prezent există o gamă variată de suporturi pentru preparate (grile şi discuri), confecţionate pe cale electrolitică din cupru, nichel, oţel inox, argint, aur, platină, molibden sau tungsten. Grilele electrolitice sunt de mai multe feluri: a) standard; b) de identificare; c) duble.

a) În cazul *grilelor standard*, criteriul internaţional de identificare este **mesh-ul**, adică numărul de ochiuri pe "inch" (2,54 cm). Ca suport pentru secţiunile ultrafine, cele mai bune grile sunt cele de 200 mesh acoperite cu o peliculă organică sau cele de 300 mesh care pot fi utilizate fără peliculă.

Grilele de 75, 100 şi cele de 150 mesh se utilizează mai puţin, deoarece au ochiuri foarte mari şi pelicula de colodiu sau de formvar cu care sunt acoperite, dacă nu este întărită cu carbon, nu rezistă la bombardamentul cu fasciculul de electroni.

b) *Grilele de identificare* au marginea solidă şi prezintă specificaţii de referinţă în interiorul ochiurilor, pentru identificare rapidă în microscop a unei zone de interes din preparat.

c) <u>*Grilele duble*</u> sunt destinate realizării de preparate sub formă de sandwich şi au pe fiecare parte câte un tip de reţea, fiind de fapt două grile suprapuse şi legate între ele.

În prezent, ca suport pentru preparat, se folosesc, în afară de grile, discuri metalice cu diametrul de 3 mm, confecţionate din cupru sau nichel cu un singur orificiu central rotund sau elipsoidal.

4.8.2. *Pelicule suport*

Pentru ca grilele să devină un bun suport pentru preparat, se acoperă cu pelicule organice sau anorganice fine, transparente la fasciculul de electroni a căror grosime nu trebuie să depăşească 200 Å.

Peliculele se obţin în laborator şi trebuie să întrunească anumite caracteristici:

- să nu se deterioreze la depunerea preparatului şi în timpul colorării sau spălării;
- să fie lipsite de structură proprie în raport cu rezoluţia microscopului;
- să aibă grosime uniformă;
- să prezinte aderenţă mare, deci să fie hidrofile;
- să nu se încarce electric în timpul iradierii cu electroni;
- să fie complet netede pentru a nu permite interferenţe la metalizare;
- să fie stabile la vidul înalt din microscop şi la bombardamentul cu electroni.

a) <u>*Peliculele organice*</u> se obţin prin diferite metode, din materiale dizolvate în solvenţi organici. De ex. pelicule din: nitrat de celuloză în acetat de amil (soluţie de colodiu, zapon - lac sau parlodion), formvar, pioloform, B, polistirol, etc.

b) <u>*Peliculele anorganice*</u> se folosesc pentru examinarea unor anumite preparate mai ales în cazul cercetărilor ce necesită o înaltă rezoluţie. Se folosesc pelicule de: aluminiu, beriliu, monoxid de siliciu sau cuarţ ce se obţin prin evaporarea în vid a acestor materiale.

În vederea măririi rezistenţei la fluxul de electroni a peliculei, pe suprafaţa acesteia se depune un strat subţire şi uniform de carbon cu ajutorul unui aparat de carbonare sub vid înalt (10^{-5} - 10^{-6} Torr).

Pe grilele pregătite prin una din metodele menţionate se depun preparatele biologice. Există o gamă largă de preparate biologice: sub formă de suspensii (molecule, virusuri, fracţiuni celulare, celule libere) secţiuni ultrafine sau replici de pe preparatele biologice, care se pot examina cu

Scanned with OKEN Scanner

microscoapele electronice de transmisie.

Depunerea suspensiilor pe grile se poate realiza prin 4 metode:

a) depunerea suspensiei cu ajutorul unei micropipete
b) depunerea preparatului prin absorbţie
c) depunerea preparatului prin întindere
d) depunerea preparatului prin pulverizare.

În cazul secţiunilor ultrafine acestea se culeg de pe suprafaţa apei din bac prin simplul contact al peliculei carbonate de pe grilă; îndepărtarea apei în exces cu ajutorul hârtiei de filtru face ca secţiunile să adere puternic la peliculă.

Grilele cu preparatul în sus se plasează într-o cutie Petri pe fundul căreia se află hârtie de filtru şi pe care se notează numărul preparatului din registrul de evidenţă.

4.8.3. *Contrastarea preparatelor biologice*

Preparatele biologice, fiind alcătuite din atomi cu numărul (Z) mic, au o putere destul de redusă de împrăştiere a electronilor şi în consecinţă, la examinarea cu microscopul electronic apar lipsite total de contrast.

Pentru mărirea contrastului biomoleculelor, al virusurilor, al diferitelor microorganisme şi al secţiunilor de ţesuturi, se recurge în practică la o serie de metode de contrastare, cele mai utilizate fiind: colorarea pozitivă, colorarea negativă şi umbrirea sau metalizarea.

4.8.3.1. **Colorarea pozitivă** are la bază interacţiunea chimică dintre structurile biologice şi un colorant format din săruri ale unor metale grele. Prin colorarea pozitivă se urmăreşte cuplarea colorantului cu moleculele preparatului biologic. Contrastul trebuie să apară ca urmare a împrăştierii electronilor de cantitatea de colorant pătrunsă în interiorul preparatului.
În cercetarea de rutină se practică o dublă colorare cu acetat de uranil şi citrat de plumb în soluţie.

4.8.3.2. **Contrastarea cu acetat de uranil.** Un număr de godeuri făcute pe o placă de plexiglas se umplu cu o soluţie de acetat de uranil 13%, utilizând o pipetă cu pară de cauciuc.

Faţa cu secţiuni ale grilelor se aplică pe suprafaţa soluţiei din godeuri lăsându-le în contact 10 min, la întuneric.

Cu ajutorul unei pense foarte fine se iau grilele de pe suprafaţa picăturilor de acetat de uranil pe care plutesc şi se spală trecându-le prin 3

băi cu alcool etilic 50%.Sugativarea alcoolului de pe grilă.

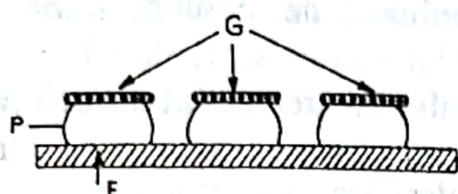


Fig.26. Tehnica contrastării secţiunilor: G- grile; P- picătura de soluţie contrastantă; F- suport.

4.8.3.3. **Contrastarea cu citrat de plumb** (soluţia Reynolds) se execută în al doilea timp.

Pe o placă de parafină curată se pune un număr de picături din soluţia Reynolds (nitrat de plumb + citrat de sodiu + apă distilată), corespunzător numărului de probe de colorat.

Peste aceste picături se aplică grilele cu preparatul în jos şi se ţin 3 min după care se spală cu apă distilată.

Excesul de apă se elimină cu o hârtie de filtru după care secţiunile pot fi examinate la microscopul electronic.

4.8.3.4. **Colorarea negativă** - este una din metodele cu cea mai largă utilizare în microscopia electronică pentru studiul virusurilor, microorganismelor şi fracţiunilor celulare. La baza ei stă metoda clasică, cunoscută în microscopia fotonică de examinare a unui preparat biologic plasat într-o soluţie care conţine un pigment întunecat (microscopia pe fond întunecat).

Pigmentul serveşte ca fond negru în care se află depus preparatul fără a-l colora proprui-zis, deci fără a interacţiona chimic cu acesta. Acest procedeu a fost adoptat pentru microscopia electronică în urma cercetărilor lui Hall (1955) şi Huxley şi apoi standardizat ca metodă de "colorare negativă".

Metoda constă în depunerea unui preparat biologic transparent la electroni (ribozomi, mitocondrii, etc) obţinut prin fracţionare celulară pe un pat de colorant opac la electroni (acid fosfotungstic, molibdat de amoniu, acetat de lantan, acetat de uranil, etc) şi apoi examinat la microscopul electronic.

Prin această tehnică se pot studia structurile tridimensionale ale biomoleculelor, virusurilor, organitelor celulare purificate.

În prezent se cunosc mai multe substanţe care, prin dizolvare în apă distilată pot servi ca matrice de includere a preparatelor biologice.

Scanned with OKEN Scanner

Substanţele care pot fi folosite cu succes pentru studiul biomoleculelor, virusurilor, structurilor subcelulare purificate sunt: acid fosfotungstic, tungstat de sodiu, de litiu, molibdat de amoniu, silicat de sodiu, nitrat de uranil, acetat de uranil, etc.

Dintre procedeele folosite curent în laboratoare, amintim: colorare directă, colorare pe grilă, colorarea prin imersiune, prin flotare şi aplicarea prin pulverizare.

4.8.4. *Metalizarea*

Pentru mărirea contrastului unui preparat biologic se foloseşte şi metalizarea care a fost multă vreme singurul mijloc de mărire a contrastului unor preparate biologice cum sunt virusurile, bacteriile şi anumite structuri ale acestora (cili, flageli, fimbrii) anumite structuri celulare în stare purificată (ribozomi, mitocondrii, membrane), unele biomolecule cum sunt acizii nucleici şi enzimele.

Metoda constă în evaporarea unui metal sub vid (aur, platină, paladiu, etc) în aparate de metalizare şi depunerea pulberii atomice sub un anumit unghi pe preparatul biologic.

Procedeul a fost folosit pentru prima dată de Muller (1942), apoi, metoda a fost perfecţionată.

În practică la aplicarea acestei metode trebuie să se ia în considerare următoarele: a) aparatul folosit la metalizare, b) materialele care urmează să fie evaporate în funcţie de preparatul biologic ce trebuie examinat, c) suportul de evaporare, d) distanţa şi unghiul de evaporare, e) grosimea stratului evaporat.

a) *Aparate de metalizare*

Numeroase firme produc diferite tipuri de aparate folosite la metalizare, din ce în ce mai perfecţionate, ce realizează un vid înaintat necesar unei evaporări de mare fineţe, au surse multiple de evaporare, oferind posibilitatea evaporării simultane din mai multe surse şi a aprecierii grosimii stratului de metal chiar în timpul depunerii.

b) *Materiale pentru metalizare*

Practica arată că cele mai bune materiale pentru metalizare sunt cele cu densitate mare şi care se depun în cantitate mică, asigurând un contrast bun preparatelor biologice. Se includ aici: cromul, aurul, aliajul aur-paladiu, uraniu, tungstenul, sau oxizii de tungsten, platina, etc.

c) *Suportul pentru evaporare*

Există o gamă largă de suporturi pentru evaporare cu care sunt echipate

Scanned with OKEN Scanner

aparatele de metalizare. Ea se poate face în: coşuleţe din tungsten, din containere mici de tungsten, molibden, .grafit sau din creuzete mici de ceramică prevăzute cu filamente de tungsten.

La alegerea suportului de evaporare în raport cu un anumit material, trebuie să se ţină seama dacă suportul produce sau nu un aliaj cu materialul ce urmează a fi evaporat.

La realizarea procesului de evaporare în vid un rol important îl are şi calitatea vidului.

Evaporarea se poate obţine în diferite moduri, foarte des fiind folosită evaporarea cu ajutorul unui arc electric (utilizat frecvent la evaporarea carbonului sau a amestecului carbon - platină).

Tehnicile de metalizare sunt de neînlocuit în cercetările privind configuraţia moleculară a acizilor nucleici, pentru obţinerea replicilor de pe diferite structuri biologice, în special în metodele de congelare şi uscare în vid sau de îngheţare, fracturarea şi sublimarea în vid şi la acoperirea preparatelor biologice ce trebuie examinate la microscoapele de transmisie (T.E.M), baleiaj (S.E.M.) sau transmisie şi baleiaj (S.T.E.M.).



Scanned with OKEN Scanner

V. METODE CURENTE DE CITO ŞI ULTRACITOCHIMIE

5.1. METODE CURENTE DE CITOCHIMIE

Prin citochimie se realizează identificarea şi localizarea unor compuşi chimici celulari pe preparatele biologice destinate studiului la microscopul fotonic.

Utilizarea tehnicilor de citochimie face posibilă vizualizarea localizării cât mai exacte a substanţelor cercetate la nivel celular prin **reacţii ce culoare**, realizându-se concomitent o analiză chimică şi una morfologică (topochimie).

Metodele citochimice trebuie să îndeplinească două condiţii esenţiale:

+ să facă posibilă identificarea specifică şi constantă a substanţei, chiar dacă aceasta se află în cantităţi foarte mici;

+ localizarea topografică precisă a substanţei cercetate.

5.1.1. ***Recoltarea pieselor*** se face prin aceeaşi tehnică descrisă la capitolul 2.1.1.

5.1.2. ***Fixarea*** se realizează prin:

a. *Agenţi fizici*- criofixare, criodeshidratare şi criosubstituţie (vezi capitolul 2.1.2.1., 2.3.3. şi 2.3.4.).

În fixarea prin agenţi fizici factorul esenţial îl reprezintă congelarea cât mai rapidă a pieselor la o temperatură cât mai scăzută.

Avantajele fixării prin agenţi fizici sunt următoarele:

+ opreşte orice activitate enzimatică împiedicând astfel autoliza celulară post-mortem;

+ conservarea structurilor celulare achivalează cu cele mai bune fixări chimice pentru citologie;

+ deplasarea substanţelor solubile sau difuzibile este mai redusă decât în orice alt procedeu de fixare.

b. *Fixarea prin agenţi chimici* trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

+ să nu deplaseze dintr-un sector în altul substanţele de cercetate;

+ să nu le dizolve;

+ să nu le modifice structura;

+ să permită desfăşurarea normală a reacţiilor chimice care urmează a fi aplicate;

Nu există agent fixator chimic universal care să conserve toate

substanţele evidenţiabile prin reacţii citochimice. Un fixator dat poate stabiliza într-o măsură mai mare sau mai mică anumite substanţe, dar în acelaşi timp, prin solubilizare, el poate îndepărta parţial sau total alte substanţe.

Cei mai utilizaţi fixatori sunt:

1. Carnoy pentru -glicogen
   -mucopolizaharide 1-2 ore
   -proteine
   -acizi nucleici
2. Formol 10% tamponat -proteine
   -lipide 12-24 ore
3. Sublimat dicromat de K. -fosfolipide 72ore

Durata fixării este mult mai strictă în citochimie şi citoenzimologie deoarece poate interveni o acţiune extractivă a fixatorului asupra unor componenţi chimici.

Volumul fixatorului va fi suficient de mare pentru a împiedica diluarea lui cu apa din piese; în timpul fixării va fi schimbat de 1-2 ori.

Temperatura fixatorului influenţează atât procesele de autoliză cât şi viteza de pătrundere în piesă. Se preferă fixarea la rece la +4^{0}C care previne autoliza dar măreşte durata fixării.

Fixatorii trebuie să aibă un p.H. cât mai apropiat de valorile fiziologice (p.H.=7,2 - 7,4).

5.1.3. ***Includerea***. Efectul tuturor factorilor implicaţi în procesul de includere (solvenţi organici, temperatura, durată,etc), asupra diferiţilor constituenţi chimici celulari trebuie bine cunoscut deoarece ceea ce s-a păstrat corect prin fixare se poate pierde la includere.

Marea majoritate a metodelor de citochimie şi citoenzimologie se realizează prin tehnica criotomiei iar cele care folosesc fixatori chimici utilizează includerea la parafină.

5.1.4. ***Secţionarea***. Pentru piesele incluse la parafină secţionarea se face după tehnica descrisă la capitolul 2.1.5.

Pentru fragmentele fixate prin agenţi fizici, secţionarea se face după tehnica descrisă la capitolul 2.3.2.

Lipirea secţiunilor pe portobiect se face cu albumină, glicerină, amidon, gelatină, etc. Soluţia pentru lipirea secţiunilor trebuie aleasă în funcţie de reacţia citochimică ce urmează să se facă, de exemplu în reacţiile

Scanned with OKEN Scanner

pentru glicogen, etc. lipirea cu aceste substanţe este contraindicată, recurgându-se la procedeul uscat.

Reacţiile citochimice au drept scop final furnizarea, la examenul microscopic al preparatului, a unui semnal (sub formă de culoare) care să ne informeze corect asupra prezenţei unei/unui grup de substanţe.

În marea lor majoritate aceste reacţii evidenţiază doar grupe de substanţe şi mai ales radicali sau funcţii chimice, ca de exemplu: proprietatea reducătoare, oxidantă, bazofilia, metacromazia, etc.

În lucrările curente de citochimie, aprecierea rezultatelor se face de obicei numai sub aspect calitativ, adică substanţa cercetată este prezentă sau absentă, completându-se cu observaţii de ordin cantitativ, precizând că substanţele respective se află în cantitate foarte redusă(±), moderată (+), mare (+ +), foarte mare (+++) sau absentă (-).

5.1.5. *Evidenţierea citochimică a unor substanţe minerale*

Detectarea citochimică a unor substanţe minerale are o deosebită importanţă pentru citofiziologie, morfopatologie, toxicologie, medicina legală, etc.

5.1.5.1. Detectarea fierului ionic (Perls-Gomori)

În ţesuturile animale fierul se află sub două forme:

+fierul ionic (Fe^{3+}) uşor de pus în evidenţă prin metode foarte specifice şi sensibile;

+fierul mascat, evidenţiabil prin metode chimice aplicate după folosirea unui procedeu de demascare.

Se recomandă fixarea în formol neutru 10% sau Bouin şi includere la parafină.

+Secţiunile deparafinate, hidratate

+După Gomori, colorarea timp de 5 minute într-o soluţie proaspătă de ferocianură de potasiu 5% după care, în baia respectivă se adaugă acid clorhidric 10% în proporţie de 1/2 din volumul reactivului se agită şi preparatele se mai lasă încă 10-20 minute.

+Spălare în apă distilată.

+Colorarea nucleară cu fuxină bazică sau safranină urmată de colorarea citoplasmei cu o soluţie apoasă saturată de acid picric timp de 5-10 secunde.

+Spălarea rapidă în apă destilată, deshidratare, clarificare şi montare

Scanned with OKEN Scanner

în balsam de Canada.

Rezultate

Ionii ferici (Fe^{3+}) reacţionează cu ferocianură de potasiu formând un precipitat granular albastru de ferocianură ferică (albastru de Prusia); nucleii se colorează în roşu iar citoplasma în galben.

5.1.5.2. **Detectarea calciului ionic (Kossa - Gomori)**

În organismul metazoarelor, calciul se află sub trei forme: ionică şi solubilă, ionică şi insolubilă, mascată.

Numai forma ionică şi insolubilă poate fi detectată prin metode citochimice.

+fixarea în formol neutru 10%, includere la parafină.

+secţiuni deparafinate şi hidratate.

+tratarea secţiunilor la întuneric cu o soluţie de nitrat de argint 2 - 5% în apa distilată timp de 5-30 minute.

+spălarea în apă distilată.

+tratarea timp de 2 minute şi la lumina zilei cu o soluţie apoasă de hidrochinonă 0,5%.

+spălarea în apă distilată.

+tratarea 30 secunde - 1minut cu o soluţie de tiosulfat de sodiu 5%.

+spălarea în apă de robinet, colorarea nucleară cu safranină, deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: Structurile conţinând săruri insolubile de calciu se colorează în negru iar nucleii în roşu.

5.1.6. *Evidenţierea citochimică a glucidelor*

Glucidele sunt aldehide-cetone a unor alcooluri polihidroxilice cu rol deosebit în activitatea celulară. Ele sunt substanţe energetice de prim ordin (ex. glicogenul); se pot combina cu proteinele (glicoproteine) sau cu lipidele (glicolipide) cu rol structural şi funcţional.

Din grupa holozidelor numai polizaharidele pot fi evidenţiate citochimic iar din cea a heterozidelor, mucopolizaharidelor (M.P.Z.) neutre şi acide, glicoproteinele şi glicolipidele.

Principiile citochimice de evidenţiere a glucidelor au la bază:

1 - reacţii bazate pe grup aldehid (ex. reacţia Schiff - P.A.S.);

2 - reacţii bazate pe grup glicol (ex. reacţia acid periodic Schiff, reacţii de blocare prin acetilare);

3 - reacţii bazate pe grup alcool (ex. esterificare sulfurică);

4 - reacţii bazate pe grup acid (ex. bazofilie, metacromazie, capturare de fier coloidal);

5 - coloraţii signaletice (ex. albastru alcian, aldehidfuxina).

Pentru exemplificarea detectării glucidelor vom recurge la metoda metacromaziei, uşor de executat pe secţiuni în timpul orelor de lucrări practice.

Colorarea selectivă a unor structuri celulare sau tisulare în alte nuanţe decât cea a soluţiei colorante se numeşte **reacţie sau coloraţie metacromatică.**

Substanţele care răspund la reacţia metacromatică fac parte din grupa mucopolizaharidelor, acizilor nucleici şi a lipidelor cu caracter acid.

+fixarea în Carnoy, include la parafină,

+deparafinare, hidratare,

+colorare timp de 2 minute în soluţie de albastru de toluidină 0.5%

+spălare în apă distilată,

+montare în glicerină-gelatină.

Rezultate: substratele metacromatice apar colorate în roşu violaceu iar restul structurilor preparatului sunt colorate ortocromatic în albastru.

Reacţia P.A.S. pozitivă pune în evidenţă glicogenul, M.P.Z. şi mucoproteinele neutre, glicoproteinele, glicolipidele.

5.1.7. *Evidenţierea citochimică a lipidelor*

Lipidele rezultă din unirea unui alcool cu acizi graşi superiori şi au rol energetic, structural şi funcţional.

Din punct de vedere chimic se clasifică în lipide simple (trigliceride sau grăsimi neutre şi sterice sau esteri de colesterol) şi lipide complexe (glicerofosfatide ca de ex. : lecitină, cefalină, cardiolipina şi sfingolipide de tipul sfingomielinei, glicosfingolipide ca de ex.: cerebrozide, cerebrosulfatide şi gangliozide.

În evidenţierea citochimică a lipidelor se recurge la coloraţii generale, reacţii pentru anumiţi radicali (carbonil, sterol), reacţii pentru evidenţierea caracterului acid, nesaturat, etc., reacţii pentru componente glucidică, proteică.

Coloraţiile generale pentru evidenţierea **lipidelor totale** se fac cu ajutorul lizocromilor Sudan BB, III şi IV; aceştia dau indicaţii asupra constituţiei chimice a lipidelor (lipide simple sau complexe). Tehnica de lucru este următoarea:

Scanned with OKEN Scanner

+ fixarea pieselor în formol neutru 10%
+ Secţiuni la gheaţă (lipidele sunt solubile în solvenţi organici motiv pentru care includerea la parafină este contrainidicată).
+ spălare în apă de robinet pentru eliminarea excesului de fixator.
+ deshidratare rapidă în alcool etilic 50% şi 70%
+ colorare timp de 30 minute în soluţie -Sudan BB -0,3g
-Alcool 70% -100cc
+ spălare, deshidratare în alcool etilic 70%, 50%, apă robinet, montare în gelatină - glicerină

Rezultate: lipidele totale se colorează în albastru.

5.1.8. *Evidenţierea citochimică a proteinelor*

Proteinele, structuri macromoleculare alcătuite din aminoacizi, reprezintă cea mai importantă grupă de substanţe organice din celule.

În raport de produşii eliberaţi prin hidroliză, proteinele se clasifică în:

1) **Holoproteine** care eliberează numai aminoacizi, cuprind:
a. proteine globulare (protamina, albumine, globuline);
b. proteine fibrilare (fibrinogen, miozină, actină, colagen, elastină, scleroproteine).

2) **Heteroproteine** sau proteine conjugate care conţin pe lângă proteine şi compuşi neproteici sau grupări prostetice. Din această grupă fac parte:
a. cromoproteine (conţin hemoporfirina);
b. glicoproteine (conţin galactoză);
c. mucopolizaharide (conţin acizi uronici, glucozamină);
d. lipoproteine (colesterol, fosfolipide, trigiceride);
e. nucleoproteine (A.D.N. şi A.R.N.);
f. metaloproteine (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}).

Din punct de vedere al nivelului de organizare structurală proteinele cuprind:
1. structuri primare - secvenţe de aminoacizi;
2. structuri secundare;
3. structuri terţiare;
4. structuri cuaternare.

Metodele citochimice detectează numai structura primară a proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

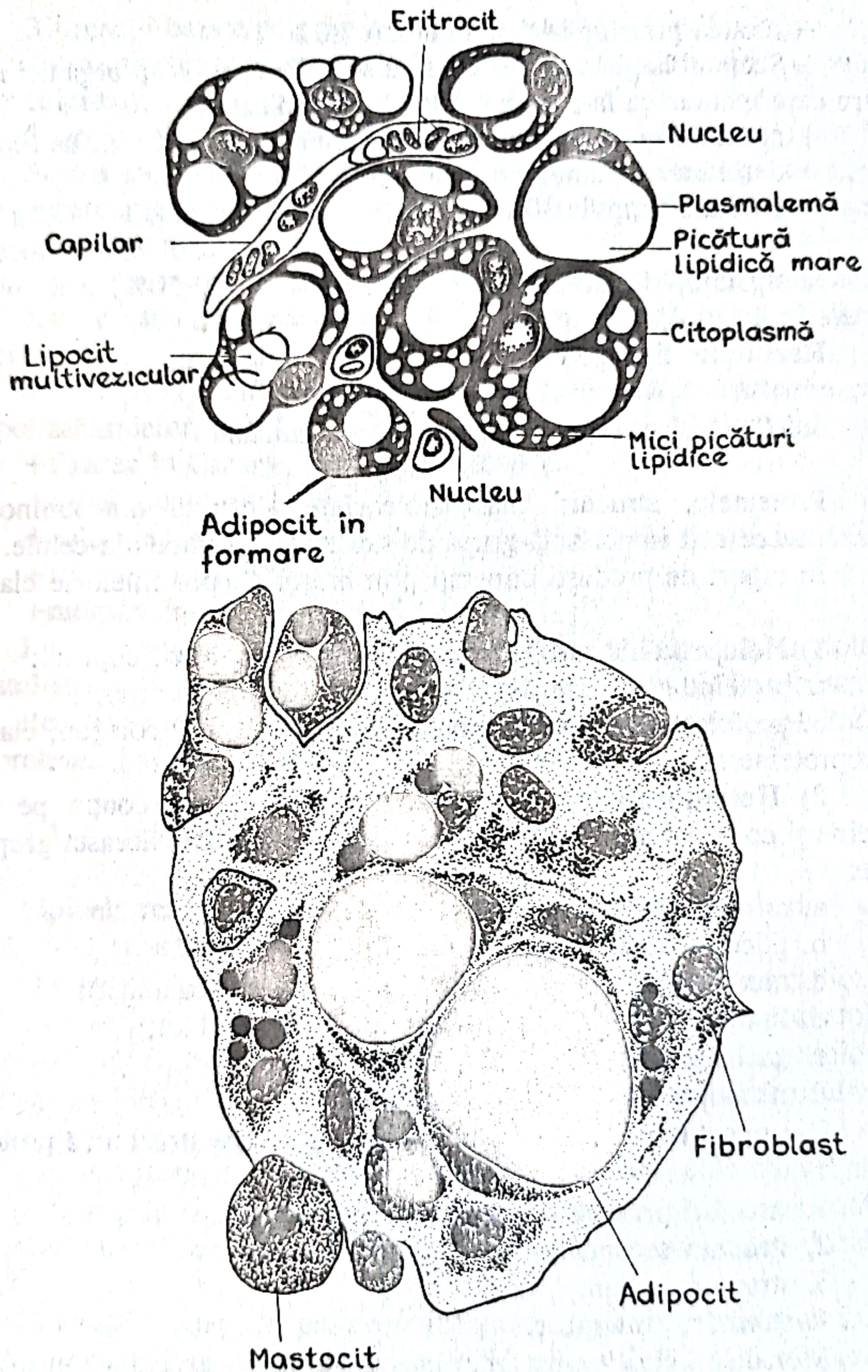


Fig.27. Aspectul lipidelor totale: A - după includerea la parafină şi colorarea cu H.E.; B - după secţionarea la gheaţă şi colorarea cu Sudan.

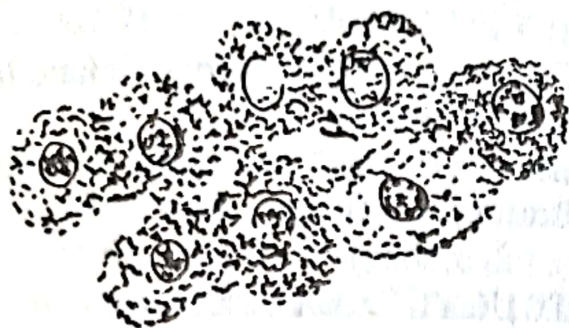


Fig.28. Proteinele totale din hepatocite (colorația cu albastru de brom - fenol).

Pentru exeplificare descriem **tehnica determinării punctului izoelectric al proteinelor prin extincție cu albastru de metilen:** care se bazează pe caracterele electropolare a unei proteine date.

Se cunoaşte că în funcție de valoarea p.H. - ului dintr-un mediu, o proteină se comportă din punct de vedere electric:

- **electronegativ** atunci când predomină grupări ionizabile carboxil (COO) funcționale, situație în care proteina are afinitate pentru coloranți bazici (cationici), maximă la p.H. alcalin;

- **electropozitiv** când predomină grupări ionizabile NH_3^+ funcționale, caz în care proteina are afinitate pentru coloranți acizi (anionici), maximă la p.H. acid.

Punctul izoelectric este valoarea p.H.-ului la care o proteină este echilibrată din punct de vedere electric (grupările ionizabile electronegative şi cele electropozitive sunt în număr egal) şi se determină prin extincția cu albastru de metilen.

Tehnica este următoarea:

+ fixarea fragmentelor de organ sau țesut în Carnoy;

+ includere la parafină;

+ deparafinarea secțiunilor, hidratare;

+ tratarea câte unui preparat cu tampon Michaelis (acetat- veronal sodic) la p.H.-uri diferite: 4,7 şi 9;

+ fiecare preparat se ține 10 minute într-o soluție de albastru de metilen 0,13% în tampon Michaelis (părți egale) cu valoarea p.H.-ului identică ce cea a tampoanelor utilizate anterior;

+ spălarea rapidă în amestecul, tampon Michaelis cu valoarea p.H. identică cu cea a soluției colorante şi apă distilată fiartă (părți egale);

+ tratarea celor trei preparate colorate la p.H.-uri diferite cu o soluție de molibdat de amoniu 5% timp de 10 minute;

+ spălare 2 - 5 minute în apă distilată;

+ sugativare, deshidratare în alcool etilic 100%, clarificare şi montare în balsam de Canada.

Rezultate: substanţele bazofile (COO)- se colorează ortocromatic în albastru, cu maximum de intensitate la p.H. alcalin.

Pentru evidenţierea acizilor nucleici se utilizează mai multe metode, cele mai utilizate fiind cele propuse de Brachet şi Feulgen.

5.2. EXAMINAREA ULTRASTRUCTURALĂ A UNOR COMPUŞI CHIMICI CELULARI

Ultracitochimia sau cercetarea la nivel ultrastructural a unor substanţe chimice se realizează prin asocierea metodelor de microscopie electronică cu cele de citochimie fotonică.

Prin aceste tehnici se pot localiza la nivel ultrastructural unele substanţe minerale şi organice.

VI. *METODE CURENTE DE CITO ŞI ULTRACITOENZIMOLOGIE*

6.1. DATE GENERALE

Enzimele sunt biomolecule de natură organică care catalizează reacţiile de sinteză şi degradare din substanţa vie, aceşti biocatalizatori joacă un rol fundamental în reglarea proceselor metabolice precum şi în toate procesele de creştere şi regenerare tisulară.

Activitatea unor enzime depinde numai de structura lor proteică pe când altele necesită prezenţa unor cofactori (componente neproteice). Cofactorul poate fi un ion metalic (K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}) sau o moleculă organică numită coenzimă (funcţionează ca transportori intermediari în toate reacţiile enzimatice).

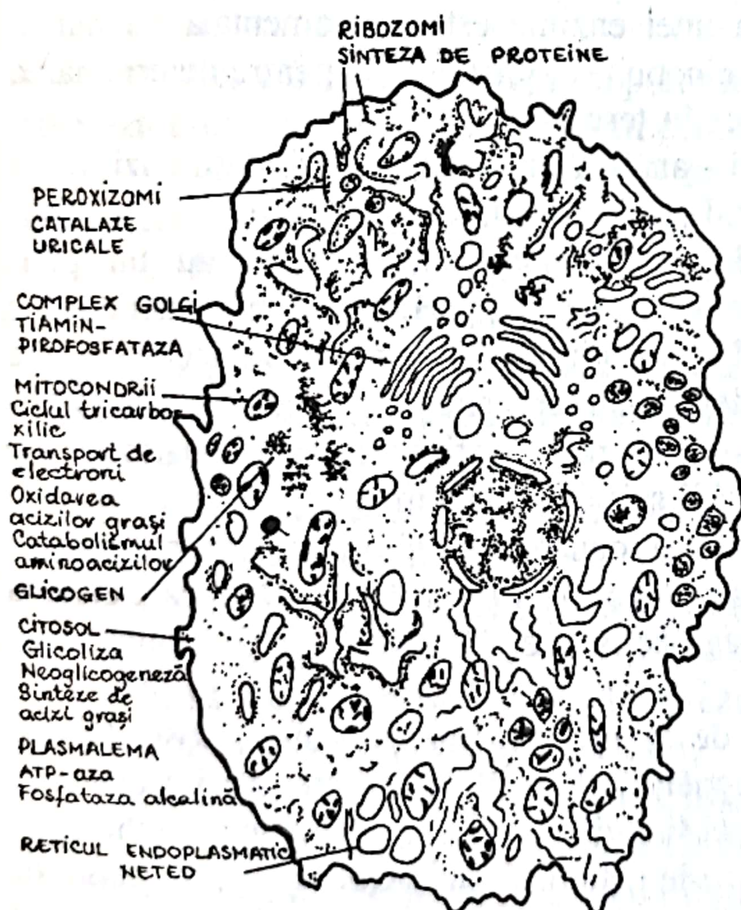


Fig. 29 Localizări enzimatice la nivelul ultrastructurilor celulare.

După clasificarea internaţională există 6 clase de enzime:

1. oxido-reductaze (reacţii de oxido-reducere);
2. transferaze (transferă grupări funcţionale);

Scanned with OKEN Scanner

3. hidrolaze (reacţii de hidroliză);
4. liaze (adiţie la dubla legătură)
5. ligaze (formare de lagături cu scindare de A.T.P.);
6. izomeraze (reacţii de izomerizare).

Citoenzimologia are drept scop evidenţierea localizării unei activităţi enzimatice în celulă care oferă o imagine reală asupra metabolismului diferitelor ţesuturi şi organe.

Localizarea enzimelor într-o celulă se realizează pe baza unor reacţii chimice între enzime şi substraturi ce au ca produs final un precipitat colorat şi insolubil; când este solubil se trece la insolubilizarea lui printr-o **"reacţie de captură"**.

Cinetica unei reacţii enzimatice este influenţată în general de următorii factori:

+ **saturarea ca substrat** reprezintă o trăsătură proprie cineticii reacţiilor chimice catalizate de enzime şi se face după ecuaţia Michaelis-Menten; constanta Michaelis a unei enzime este fundamentală nu numai pentru formularea matematică a cineticii enzimatice ci şi pentru determinarea cantitativă a activităţii enzimatice în ţesuturi.

+ **concentraţia enzimei** - analiza cantitativă a activităţii enzimatice se realizează uşor când substratul sau produsul sunt colorate.

+ **valoarea p.H.-ului** - cele mai multe enzime au un p.H. caracteristic la care activitatea lor este maximă; p.H.-ul optim al unei enzime nu este neapărat identic cu p.H.-ul mediului său normal, intracelular, care se poate afla pe panta ascendentă sau descendentă a curbei sale p.H.-activitate (aceasta sugerează că relaţia p.H.- activitate a unei enzime poate fi un factor de control al activităţii sale intracelulare).

+ **temperatura de lucru** - se cunoaşte că viteza reacţiilor catalizate de enzime creşte cu temperatura pe intervalul de temperatură în care enzima este stabilă şi îşi păstrază întreaga activitate, în mod obişnuit, temperatura de lucru este de 37^0C.

+ **activatorii** reacţiilor de cataliză enzimatică - sunt substanţe care măresc viteza de reacţie fie acţionând prin deblocarea unei părţi proteice ce maschează partea activă a enzimei fie prin protejarea enzimelor de inhibitori.

+ **inhibitorii** reacţiilor de cataliză enzimatică sunt o clasă de substanţe din al căror studiu rezultă informaţii valoroase asupra mecanismului şi căilor de cataliză enzimatică, asupra specificităţii de substrat a enzimelor, a naturii grupelor funcţionale din centrul activ şi a participării anumitor grupe funcţionale la menţinerea informaţiei active a moleculei de enzimă; în plus, inhibiţia anumitor enzime de către metaboliţi specifici este

un element important în reglarea metabolismului intermediar.

+ **timpul de incubaţie**: prin cercetări biochimice s-a constatat a fi de 20-30 minute.

6.2. TEHNICA CITOENZIMOLOGICĂ

Principalele etape ale obţinerii preparatului pentru reacţii enzimatice sunt în parte asemănătoare cu cele din citologia clasică (recoltarea, fixarea, secţionarea, montarea) dar prezintă două etape caracteristice: incubarea şi vizualizarea.

6.2.1. ***Recoltarea.*** Spre deosebire de citologia clasică, reacţiile citoenzimologice se fac numai pe fragmente de ţesuturi sau organe recoltate "in vivo" (intervenţii chirurgicale sau puncţii - biopsie) sau imediat după sacrificarea animalelor de experianţă.

6.2.2. ***Fixarea*** are drept scop conservarea activităţii enzimatice şi o stabilizare cât mai mare a enzimei în celulă. În acest scop se pot utiliza:

a. **fixatori fizici**- congelarea rapidă a fragmentelor montate pe portobiecte, în azot lichid la -180^{0}C este cea mai utilizată;

b. **fixatori chimici**: glutaraldehidă, alcool, acetonă.

6.2.3. ***Incubarea*** reprezintă cea mai importantă etapă din tehnica de evidenţiere a unei activităţi enzimatice, folosind în acest scop un mediu care să ofere enzimei condiţii optime pentru desfăşurarea activităţii ei.

Utilizarea mediului de incubaţie, diferit în raport de enzima cercetată, are două scopuri majore:

a. să permită formarea cuplului enzimă+substrat care reprezintă de fapt activitatea enzimatică;

b. să facă insolubil produsul de reacţie (enzimă+substrat).

Enzimele prezintă două fracţiuni:

+ o fracţiune hidrosolubilă sau lioenzimă;

+ o fracţiune liposolubilă numită desmoenzimă

Lioenzimele se pierd în timpul diferitelor manopere pentru obţinerea prepartatului citoenzimatic, evidenţiindu-se desmoenzimele.

Dacă produsul de reacţie (enzimă + substrat) este solubil ca în cazul hidrolazelor, el trebuie transformat într-un produs insolubil printr-un procedeu numit "captură". De exemplu dacă produsul de reacţie este un anion (fosfat, carbonat), el devine insolubil prin captarea de ioni metalici

(plumb).

Pentru realizarea acestor scopuri mediul de incubare trebuie să conţină:

+ substratul specific (natural sau sintetic) enzimei a cărei activitate urmează a fi pusă în evidenţă (exemplu de substrat pentru evidenţierea activităţii oxidoreductazei utilizează sărurile de tetrazoliu);

+ substanţa care asigură insolubilizarea produsului de reacţie (în cazul fosfatazelor, prin hidroliză enzimatică se eliberează anionul fosfat care este precipitat prin "captura" de cationi de Ca^{2+} pentru fosfataza alcalină şi Pb^{2+} pentru fosfataza acidă; aceşti "cationi de captură" se adaugă mediului de incubaţie sub formă de clorură de calciu şi respectiv azotat de plumb);

+ substanţa care permite vizualizarea, de exemplu sulfura de amoniu va forma în cazul fosfatazei acide - sulfura de plumb - substanţă cromoforă de culoare brun închisă (aceasta poate fi vizualizată microscopic şi indică citotopochimic activitatea enzimatică a fosfatazei acide;

+ soluţii tampon care conferă mediului de incubare un anumit p.H., ştiut fiind faptul că activitatea fiecărei enzime se desfăşoară la un anumit p.H. optim de acţiune.

O importanţă deosebită o are **timpul de incubare**, stabilindu-se că saturarea enzimei cu substrat se face în aproximativ 20 minute; se recomandă totuşi tatonarea timpului optim de incubare. Pentru a căpăta certitudinea specificităţii de reacţie este necesară efectuarea unor preparate de control care se obţin prin diferite procedee, de activare sau inhibare a activităţii enzimatice.

6.2.4. ***Montarea*** secţiunilor se face cu medii hidrosolubile - glicerina şi siropul Apathy.

6.2.5. Prin ***vizualizarea*** activităţii enzimatice se înţelege detectarea şi localizarea la microscop a unei anumite culori cu aspect granular sau difuz.

Vizualizarea indică în principiu: locul activităţii enzimatice (aspectul citotopochimic al vizualizării) şi intensitatea tinctorială care pune în evidenţă intensitatea activităţii enzimatice (aspectul de citoenzimologie cantitativă a vizualizării).

ATENŢIE: preparatele citoenzimologice trebuie examinate şi fotografiate imediat după realizarea lor deoarece se degradează rapid (decolorarea sau cristalizarea mediului în care s-a făcut montarea).

6.3. DETECTAREA CITOENZIMOLOGICĂ A OXIDO -REDUCTAZELOR

Enzimele din grupul oxido-reductazelor catalizează reacţiile de oxidare şi reducere din celula vie.

Reacţiile de oxido-reducere (reacţii redox) sunt acele reacţii în care are loc un tranfer de electroni de la un donator de electroni (agentul reducător) la un acceptor de electroni (agentul oxidant).

Transportul de electroni este principalul izvor motor al activităţiilor celulare deoarece el eliberează o mare cantitate de energie liberă, conservată în mare parte sub forma grupărilor fosfat macroergice ale A.T.P.- ului, în urma procesului numit fosforilare oxidativă.

Există patru tipuri de enzime de oxido-reducere sau proteine care transferă electroni:

1. *Dehidrogenazele legate de nucleul piridinic*, sau piridin-dependente (necesită drept coenzime N.A.D. sau N.A.D.P.) dintre care unele sunt localizate în mitocondrii (beta-hidroxi-butirat dehidrogenază), altele în citoplasmă (lactat dehidrogenază) iar unele se găsesc în ambele componente (malat-dehidrogenază).

2. *Dehidrogenazele legate de nucleul flavinic* sau flavin-dependente conţin flavin-adenin dinucleotid (F.A.D.) sau flavin mononucleotid (F.M.N.) care funcţionează mai degrabă ca grupare prostetică decât ca o coenzimă.

Din această grupă fac parte N.A.D./H. - dehidrogenaza şi succinat dehidrogenaza (clasa dehidrogenazelor care conţin fier şi sulf) şi D-aminoacid oxidaza (clasa oxidaze), ele făcând parte din echipamentul enzimatic mitocondrial; mai fac parte: dihidrolipoil dehidrogenaza (un component al sistemelor piruvat şi alfa - cetoglutarat dehidrogenazelor) şi acetil - CoA dehidrogenaza (care catalizează prima etapă de dehidrogenare din oxidarea acizilor graşi).

3. *Proteine cu fier-sulf* (centrii Fe - S) din care proteina cu fier-sulf cu potenţial mare (cu citocrom C_1) este localizată la nivel mitocondrial.

4. *Citocromii* sunt proteine transportatoare de electroni care conţin grupări porfirinice cu fier, prezenţi numai în celulele aerobe.

Unii sunt localizaţi în membrana internă a mitocondriilor unde acţionează secvenţial pentru a transporta electronii proveniţi de la diferite sisteme ale dehidrogenazelor până la oxigenul molecular (citocromii b, C_1, C, a şi a_3) - iar alţii se află în reticulul endoplasmatic jucând un rol important în reacţiile de hidroxilare specializate (citocromul b_5).

Scanned with OKEN Scanner

Succinat dehidrogenaza

Activitatea acestei enzime se poate pune în evidenţă prin tehnica lui Nachlas şi colaboratorii.

Se folosesc secţiuni obţinute la criotom din ficat sau muşchi striat proaspăt.

Principiul este următorul: succinat dehidrogenaza eliberează hidrogenul din sărurile acidului succinic pe care le transformă în fumarat; hidrogenul eliberat este acceptat de o sare de tatrazolium care se reduce în formazan insolubil şi colorat.

Rezultatul pozitiv al reacţiei este indicat de un precipitat bleu de diformazan (granule violete prin metoda Pearse).

6.4. DETECTAREA CITOENZIMOLOGICĂ A HIDROLAZELOR

Hidrolazele sunt enzime care catalizează reacţiile de scindare hidrolitică a moleculelor complexe: proteinele în aminoacizi, polizaharidele în monozaharide, lipidele în acizi graşi şi glicerină.

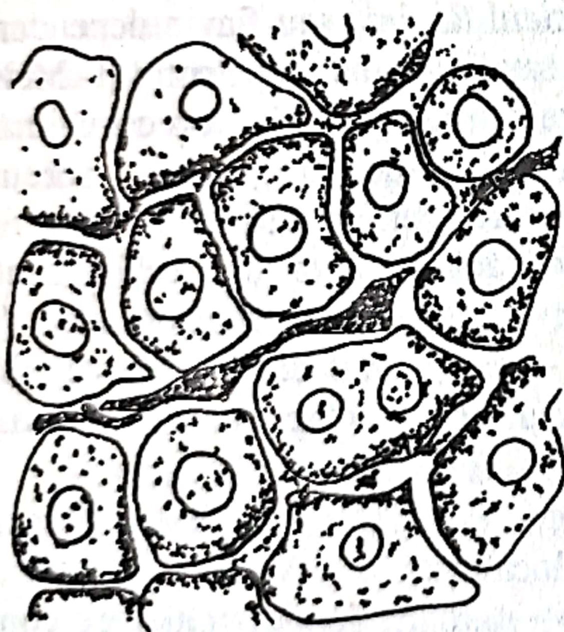


Fig.30. Fosfataza acidă la nivelul hepatocitelor.

Fosfataza acidă.

Este enzima marker a lizozomilor; activitatea ei se detectează cu tehnica Gomori.

Principiul acestei reacţii constă în faptul că fosfataza acidă acţionează asupra beta - glicerofosfatului de sodiu (substrat cu p.H. 5 - 5,7) pe care îl hidrolizează în glicerol şi ortofosfat de sodiu - acesta din urmă reacţionează

cu ionii de Pb^{2+} formând fosfatul triplumbic insolubil care, în prezenţa polisulfurii de amoniu se transformă într-un precipitat de sulfură de plumb.

Rezultate: locurile cu activitate acid fosfatazică apar sub forma unor granule negru-brun.

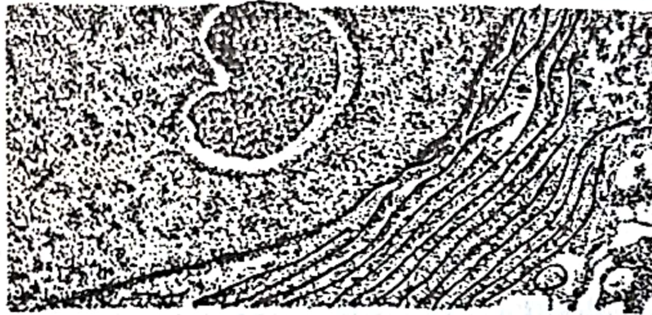


Fig.31. Activitatea peroxidazei la nivel ultrastructural.

VII. *STUDIUL GENERAL AL CELULEI ŞI AL ÎNVELIŞULUI CELULAR*

7.1. DATE GENERALE DESPRE CELULĂ

Celula reprezintă unitatea morfologică şi funcţională a lumii vii formată la regnul animal din:

A. Protozoare sau unicelulare.

B. Metazoare sau pluricelulare.

Marea majoritate a protozoarelor şi toate metazoarele sunt alcătuite din celule care au următoarea structuralizare:

I. **Învelişul celular** format din glicoalix, plasmalemă şi citoscheletul membranar, care separă mediul celular de cel extracelular.

II. **Protoplasma**, la nivelul căreia se desfăşoară marea majoritate a proceselor biochimice ce menţin viaţa (fosforilarea oxidativă, biosinteze, etc.), cu participarea nemijlocită a învelişului celular. Ea formează:

1 - *nucleul* şi

2 - *citoplasma*.

La rândul său, citoplasma formează două compartimente:

a. citoplasma nestructurată sau **hialoplasma** (substanţa fundamentală a citoplasmei);

b. citoplasma structurată sau **morfoplasma** alcătuind organitele celulare: ribosomii sau corpusculii lui Palade, reticulul endoplasmatic neted şi rugos, complexul Golgi, mitocondriile, lizozomii, peroxisomii, centrul celular (centriolii), microtubii şi microfilamentele.

În afara organitelor celulare, în citoplasmă se pot găsi incluziunile celulare care reprezintă substanţe de rezervă (picături de grăsime, glicogen), produse de secreţie (pigmenţi), acumulări de produşi exogeni (particule de cărbune, siliciu).

Celulele cu o astfel de structură se numesc **Eucariote**, termen introdus de Chatton în 1925.

O mică parte din protozoare ca de exemplu bacteriile, nu au nucleu iar cromatina (A.D.N. - ul) se dispune sub forma unor bulgări numiţi nucleotizi sau echivalenţi nucleari. Aceste unicelulare fără înveliş nuclear (din care mai fac parte algele albastre - verzi, micoplasmele) sunt denumite **procariote**.

Scanned with OKEN Scanner

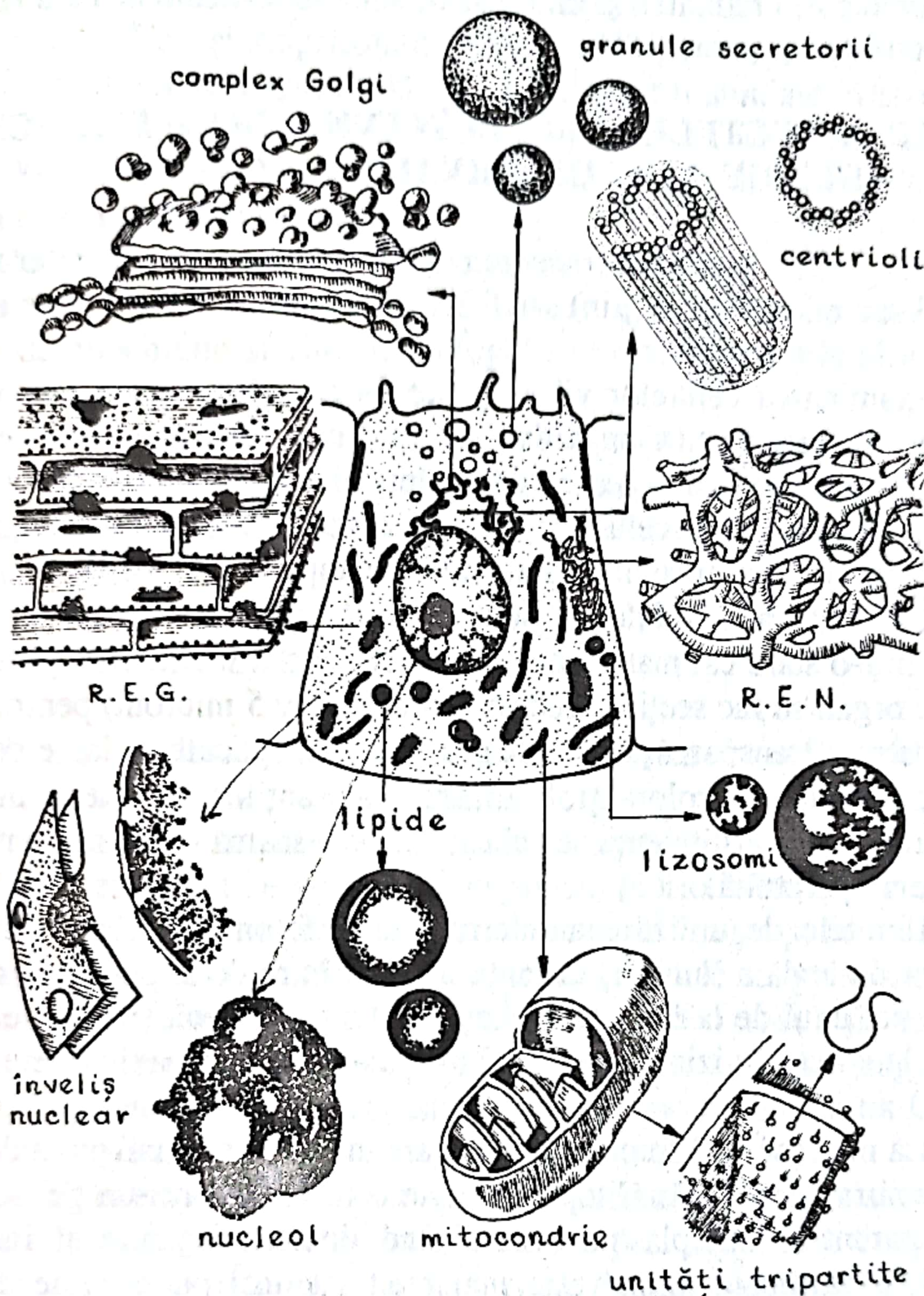


Fig.32. Aspectul structural al celulei în microscopia fotonică şi electronică.

Din punct de vedere evolutiv, procariotele sunt considerate strămoşii eucariotelor şi, în ciuda diferenţelor semnalate mai sus, există totuşi o asemănare în organizarea şi funcţionarea lor moleculară: folosesc acelaşi cod genetic şi au un mecanism similar de proteogeneză.

Viruşii deşi au proprietăţi comune cu organismele vii:

autoreproducere, ereditatea şi imunitatea, sunt dependente de celulele gazdă şi sunt consideraţi paraziţi.

7.2. ASPECTELE CELULEI ÎN FUNCŢIE DE TEHNICILE DE STUDIU ŞI DE OBSERVARE

7.2.1. ***În microscopia fotonică*** unitatea de referinţă este micronul sau micrometrul (μm) sau 10^{-3} mm deoarece dimensiunile celulelor sunt de ordinul micronilor.

Examinarea celulelor vii se poate face cu microscopul fotonic însă diferenţele de refringenţă ale constituienţilor celulari fiind foarte redusă nu permite observaţii de precizie şi detaliate; microscopia în contrast de fază permite studiul mişcării celulelor vii care poate fi microcinematografiată.

În mod obişnuit celulele sunt studiate după fixare şi colorare (în stare moartă). Substanţele fixatoare sunt utilizate pentru fixarea structurilor celulare într-o stare cât mai apropiată posibil de cea vie. Din fragmentele de ţesut sau organ se fac secţiuni subţiri (aproximativ 5 microni) pentru a putea fi studiate prin transparenţă. Aceste secţiuni sunt aplicate pe lame portobiect şi colorate cu diverşi coloranţi. Utilizarea coloranţilor permite studiul unuia sau altuia din constituienţii celulari, ţinând seama însă de puterea de rezoluţie a aparatului.

Limitele de utilizare a microscopului fotonic sunt determinate de lungimea de undă a luminii; distanţa minimă între două puncte care se pot distinge net unul de celălalt se numeşte **putere de rezoluţie** şi este de 0,25 microni în spectrul vizibil (300 - 850 mm) iar mărimea maximă este de 1500 x - 2000 x.

La microscopul fotonic celula apare mai mult sau mai puţin delimitată de o membrană celulară. Citoplasma este constituită dintr-un gel semilichid şi transparent - hialoplasma - conţinând diferite organite şi incluziuni. Nucleul, a cărui membrană este mai mult sau mai puţin evidentă, ocupă diferite poziţii în celulă; acest examen mai precizează că talia şi forma unei celule sunt variabile de la un tip celular la altul şi deseori, în timp, pentru aceeaşi celulă.

Utilizarea unor reacţii de culoare specifice anumitor substanţe chimice sau a unor activităţi enzimatice - permite localizarea lor în celulă (citochimie şi citoenzimologie).

7.2.2. ***Microscopia electronică*** utilizează electronii în loc de fotoni şi are o putere de rezoluţie aproape de limita teoretică posibilă 1,2 Å.

În microscopia electronică unitatea de măsură este milimicronul sau nanometrul (10^{-9} m) şi Ångstromul (Å) sau 10^{-10} m.

Ca şi în microscopia fotonică, celulele pot fi studiate în stare vie cu ajutorul microscopului electronic de voltaj înalt (tensiune de accelerare 3.500.000 - 4.000.000 V), sau stare moartă, fixate prin diferite metode şi secţionate la o grosime sub 600 Å.

Cu ajutorul microscopului electronic de transmisie se poate studia ultrastructura celulei la nivel molecular iar prin aplicarea unor tehnici speciale de citochimie şi citoenzimologie se pot localiza diferite substanţe chimice şi activităţi enzimatice.

Microscopul electronic cu baleiaj oferă posibilitatea studierii reliefului suprafeţei celulare iar prin tehnica criodecapajului care permite clivarea membranelor celulare se poate evidenţia relieful celor două suprafeţe de clivaj (replici).

7.3. FORMA CELULELOR

Forma celulelor este foarte variată datorită funcţiilor de o mare diversitate şi raporturilor diferite dintre ele precum şi caracterele fizico-chimice ale mediului în care îşi desfăşoară activitatea.

Din acest punct de vedere, un organism pluricelular este format din:

A. *Celule cu forme schimbătoare* - fac parte din grupul celulelor care îşi desfăşoară activitatea într-un mediu lichid (celulele sanghine), având în mod obişnuit o formă sferică sau ovalară. Părăsind vasul şi trecând în ţesuturi, monocitele, îşi modifică forma căpătând un contur neregulat prin emiterea de pseudopode. Din această grupă mai fac parte şi alte celule ale sistemului fagocitar.

Un alt exemplu îl constituie epiteliul mucoasei vezicii urinare care se aplatizează în momentul în care ea se destinde prin acumulare de urină.

B. *Celulele cu forme fixe* reprezintă marea majoritate a celulelor dintr-un organism pluricelular. Forma lor variază în funcţie de natura celulelor, a funcţiilor specifice şi a influenţelor mecanice exercitate de elementele vecine.

Se întâlnesc:

1. *Celule sferice* - de ex. ovulul, celula grasă sau adipocitul, granulocitele din torentul circulator.

2. *Celulele poliedrice* (cubice şi prismatice) intră alcătuirea ţesutului epitelial (simplu şi stratificat).

+ cubice: epiteliul foliculilor tiroidieni, etc;

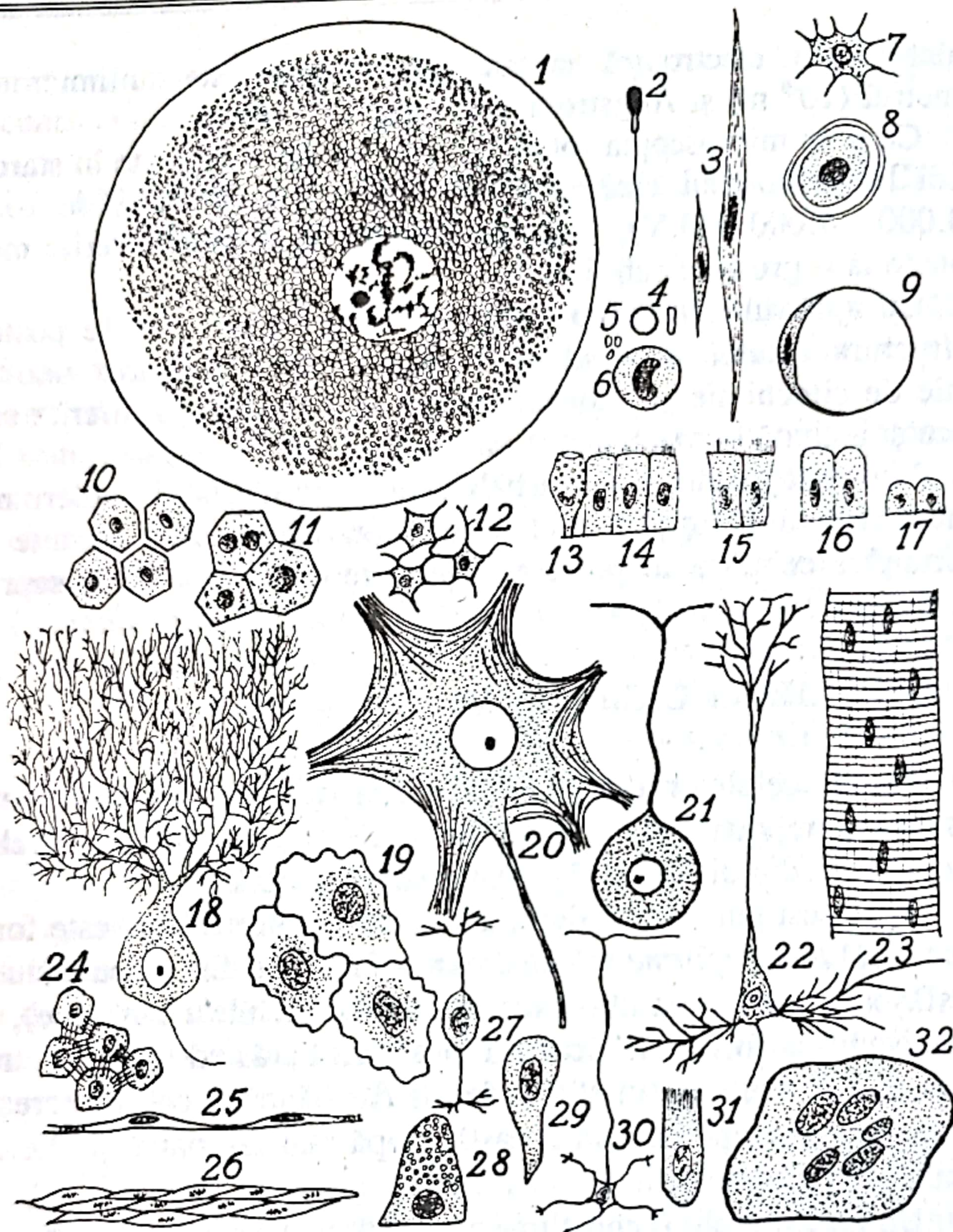


Fig.33. Forma şi talia celulelor organismului. 1-ovul; 2-spermatozoid; 3-fibre misculare netede; 4-hematii; 5-globuline; 6-leucocit mononuclear; 7-celulă osoasă; 8-celulă cartilaginoasă; 9-celulă adipoasă; 10-celule din epiteliul posterior al corneei; 11-celule hepatice; 12-celule conjunctive; 13-celulă mucoasă; 14-celule din epiteliul intestinal; 15-celule cu cili vibratili; 16-celule prismatice; 17-celule cubice; 18. celulă nervoasă din cerebel; 19-celulă epitelială turtită; 20-celulă nervoasă multipolară; 21-celulă nervoasă unipolară; 22-celulă nervoasă piramidală; 23-fibră musculară striată; 24-celule spinoase din tegument; 25-celule endoteliale; 26-celule turtite suprapuse; 27-celulă nervoasă bipolară; 28-celulă glandulară; 29-celulă vezicală; 30-celulă din stratul profund al cerebelului; 31-celulă auditivă; 32-celulă din măduvă osoasă (policariocit).

+ prismatice: epiteliul mucoasei intestinale, etc.

3. *Celulele pavimentoase* iau parte la formarea seroaselor: pleură, pericard seros (mezotelii), endoteliul vascular, epiteliul foiței parietale a capsulei Bowmann (corpusculul renal Malpighi);

4. *Celule fuziforme* au partea centrală mai îngroșată iar cele două capete efilate (celula musculară netedă);

5. *Celule cu prelungiri* (celula nervoasă, osteocitul).

În condiții patologice și unele stări fiziologice, aceste forme se pot schimba; de exemplu fibrocitul, celulă conjunctivă fusiformă cu contur neregulat, poate deveni sferic prin acumulare de grăsimi.

7.4. DIMENSIUNILE CELULELOR

Afară de câteva excepții, toate celulele organismelor pluricelulare au dimensiuni sub limita de rezoluție a ochiului uman (diametrul lor este de ordinul micronilor), ele variind de la un tip celular la altul și în raport de specie.

Cea mai mare celulă din organismul uman este ovulul care are un diametru de 200 - 250 microni; unii motoneuroni din coarnele anterioare ale măduvii spinării au diametrul pericarionului de 100 microni. Celulele musculare striate pot atinge lungimi de 10 - 12 cm dar acestea sunt elemente gigante multinucleate și nu elemente celulare cu un singur nucleu ca în exemplele citate.

Dimensiunile medii, cel mai frecvent întâlnite sunt cuprinse între 20-40 microni (celule epiteliale, conjunctive, etc).

Cele mai mici celule sunt cele din stratul granular al scoarței cerebeloase ale căror diametru este de 4 - 5 microni. Dimensiunile celulelor suferă modificări în raport de starea funcțională, de condițiile mediului în care își desfășoară activitatea și de vârstă; de ex. celulele tinere (blastele) au dimensiuni mai mari decât cele adulte (citele) sau cele îmbătrânite.
Volumul celulelor variază între 200 și 1500 microni.

7.5. NUMĂRUL CELULELOR

Numărul celulelor este variabil de la o specie la alta și relativ constant la indivizi din aceeași specie.

La organismele superioare și în special la om nu se poate vorbi de o constantă numerică absolută. La om, numărul de celule care alcătuiesc

fiecare organ este deosebit de ridicat (de ex. creierul uman este format din aproximativ 17.000.000.000 celule iar numărul de hematii este evaluat la 25.000.000.000.000.

7.6. ÎNVELIŞUL CELULAR

Învelişul sau periferia celulară este structura morfofuncţională complexă care separă mediul intracelular de cel extracelular, prin intermediul căruia se realizează comunicarea dintre cele două compartimente.

În microscopia electronică, periferia celulară apare ca o structură foarte complexă formată din:

1 - plasmalemă (membrană celulară sau plasmatică);

2 - glicoalix;

3 - citoscheletul membranar.

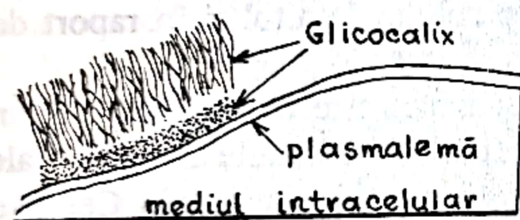


Fig.34. Membrana plasmatică şi glicoalixul.

7.6.1. *Plasmalema*

Plasmalema este o membrană biologică cu o grosime de 7,5 - 10 nm.

7.6.1.1. **Structura morfologică.** În desenele didactice după examinarea preparatelor la microscopul fotonic se obişnuieşte ca fiecărei celule să i se prezinte periferia printr-o linie considerată ca membrană celulară.

Prin dimensiunile ei, plasmalema nu este vizibilă la microscopul fotonic dacă este secţionată transversal şi după o coloraţie de rutină.
La microscopul electronic, membrabei celulare i se disting trei straturi (structură trilamelată):

+ **o pătură internă,** densă la fluxul de electroni (osmiofilă) cu o grosime de 2,5 nm.

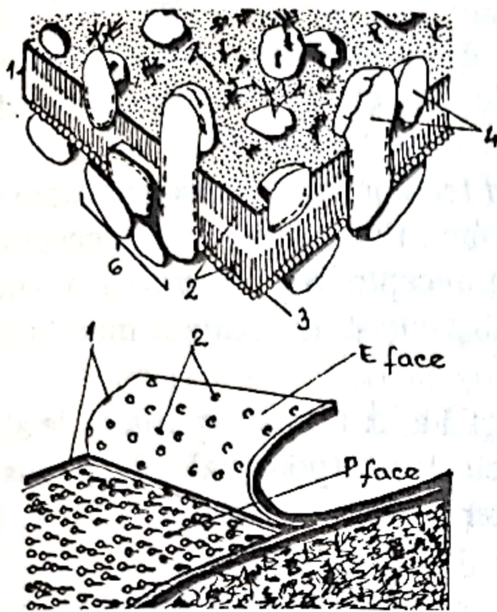


Fig.35. Ultrastructura membranei celulare. 1-strat bimolecular lipidic; 2-grupări hidrofobe; 3-grupări hidrofile; 4-proteine membranare; 5-lanţuri glucidice; 6-sisteme enzimatice membranare.

+ **o pătură mijlocie**, puţin densă la fluxul de electroni (osmiofobă) cu o grosime de 3 nm;

+ **o pătură externă**, densă la fluxul de electroni (osmiofilă) cu o grosime de 2,5 nm.

Prin criofractură se poate studia aspectul celor două feţe de fractură evidenţiindu-se proteinele transmembranare (planul de criofractură trece prin mijlocul bistratului lipidic).

7.6.1.2. **Organizarea moleculară.** Studiile de biochimie au relevat că plasmalemele sunt formate din lipide, în special fosfolipide (40%), proteine (60%), glucide asociate.

În momentul de faţă, plasmalema este considerată ca un edificiu fluid traversat de proteine; acestea sunt transportori activi, complexe multienzimatice, receptori, etc.

După modelul în mozaic fluid al lui Singer şi Nicolson (1972), membrana celulară este formată dintr-o dublă pătură lipidică traversată total sau parţial de proteine; acest model explică fluiditatea membranară (deplasarea constituienţilor lipidici şi proteici), fuziunea membranară, activităţile enzimatice şi antigenice.

7.6.1.3. **Rolurile şi proprietăţile plasmalemei**

1. *Proprietăţi mecanice* - membrana celulară este extensibilă, elastică şi plastică. Ea poate prezenta diferenţieri morfologice de tipul zonelor de

Scanned with OKEN Scanner

adezivitate celulară, etc.

2. *Schimburile cu mediul exterior* (permeabilitate) adică trecerea particulelor vizibile la microscopul fotonic sau electronic (fenomene de citoză), prin membrana celulară.

3. *Proprietăţile antigenice corespund* fenomenelor de recunoaştere şi sunt legate de existenţa receptorilor de suprafaţă. Fiecare din aceşti receptori poate fixa un element străin (virus, proteine, receptorul de suprafaţă al altei celule, hormon proteic, etc). Fixarea unei substanţe străine induce modificări în activitatea celulară.

4. *Încărcări electrice*. Repartiţia inegală a ionilor de o parte şi de alta a membranei antrenează polarizarea sa electrică (potenţial de repaus).

Modificările de polarizare dau naştere curenţilor de acţiune de la suprafaţa membranei.

La microscopul fotonic, plasmalema poate fi pusă în evidenţă prin unele reacţii de detectare a unor substanţe chimice sau a unor activităţi enzimatice localizate la nivel membranar.

7.6.2. *Glicoalixul*

Glicocalixul sau glicolema este o pătură glico-lipo-proteică situată pe suprafaţa externă a membranei plasmatice, de a cărei integritate depinde în mare măsură activitatea celulară.

La microscopul fotonic, glicoalixul nu poate fi pus în evidenţă decât prin reacţii de detectare citochimică a componentei glucidice (reacţia P.A.S., cu albastru alcian, cu fier coloidal, etc) sub forma unei linii de culoare roşie sau albastră.

La microscopul electronic, glicoalixul cu o grosime de aproximativ 50 nm, are un aspect fibrilar şi prezintă două zone: una internă sau învelişul de suprafaţă de 20 nm, mai puţin densă la fluxul de electroni şi una externă de 30 nm, densă la fluxul de electroni. Această componentă a învelişului celular poate fi studiată mai bine printr-o tehnică specială care foloseşte feritină cationizată.

DE REŢINUT: glicoalixul este numai o componentă a complexului sistem care este membrana celulară.

7.6.3. *Citoscheletul membranar*

Citoscheletul membranar este constituit din reţele fibrilare cu rol în stabilizarea infrastructurii membranei şi în mişcările locale ale suprafeţei

celulare; reprezintă de fapt zona periferică a citoscheletului celulei şi este constituit din proteine de tipul actinei, spectrinelor, ankirinei, etc.

7.7 SPECIALIZĂRILE ÎNVELIŞULUI CELULAR

Specializarea este o diferenţiere structurală sau o transformare morfologică complexă care conferă celulei o anumită funcţie; se clasifică în temporare (de ex. emiterea de pseudopode) şi permanente.

Specializările permanente se găsesc la nivelul plasmalemei polului apical, polului bazal şi la nivelul contactului a două celule vecine.

7.7.1. ***Specializările plasmalemei polului apical*** sunt evaginări ale ectoplasmei acoperite de membrană situate la nivelul suprafeţei celulare care vine în contact cu mediul exterior. Ele asigură celulei o funcţie bine stabilită ca de exemplu funcţia resorbativă.

Din punct de vedere morfologic ele se clasifică în microvili, cili vibratili şi flageli.

7.7.1.1. **Microvilii** sunt expansiuni digitiforme ale suprafeţei libere celulare care se găsesc:

+ **izolate**: la nivelul epiteliului mucoasei gastrice;
+ **grupate**: la nivelul:
    - enterocitelor - platou striat
    - nefrocitelor - margine în perie
    - celulelor epiteliale din epididin şi canale deferente - stereocili.

a. *În microscopia fotonică* microvilii apar sub forma unor striaţii perpendiculare pe suprafaţa plasmalemei apicale.

b. *În microscopia electronică* microvilii platoului striat au dimensiuni egale iar a marginii în perie, inegale; sunt limitaţi la periferie de plasmalema trilamelată la exteriorul căreia se află un strat gros de glicoalix. Citoplasma lor prezintă o zonă periferică de 40 - 30 nm lipsită de structură şi o zonă centrală care conţine 10 - 50 microfilamente de actină cu dispoziţie paralelă.

Prin tehnicile de citoenzimologie se evidenţiază o intensă activitate A.T.P. - azică şi a fosfatazei alcaline.

Stereocilii sunt elemente imobile a căror formă şi structură este asemănătoare cu cea a microvililor deosebindu-se de aceştia prin numărul mic al microfilamentelor dispuse neregulat. Se aglomerează mai mulţi la un loc formând conglomerate cu rol în ghidarea produşilor de secreţie.

Scanned with OKEN Scanner

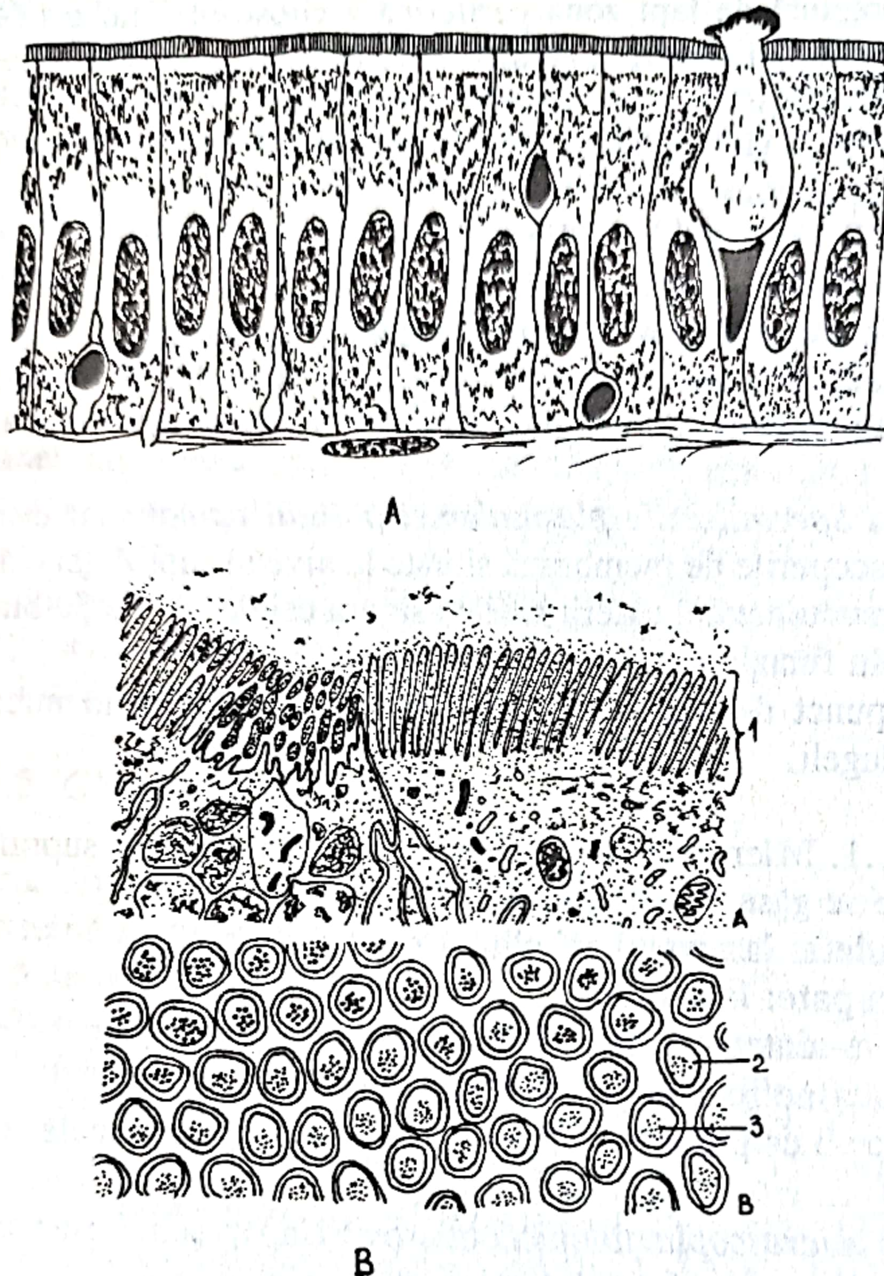


Fig.36. Microvilii: A - în microscopia fotonică; B - în microscopia electronică; A - secţiune longitudinală; B - secţiune transversală; 1 - microvili; 2 - plasmalemă; 3 - microfilamente.

7.7.1.2. **Cilii vibratili** sunt expansiuni citoplasmatice mobile delimitate de plasmalemă care prezintă mişcări de pendulare şi ondulatorii. Se găsesc la polul apical al epiteliului căilor respiratorii superioare, trompă uterină, etc.

Scanned with OKEN Scanner

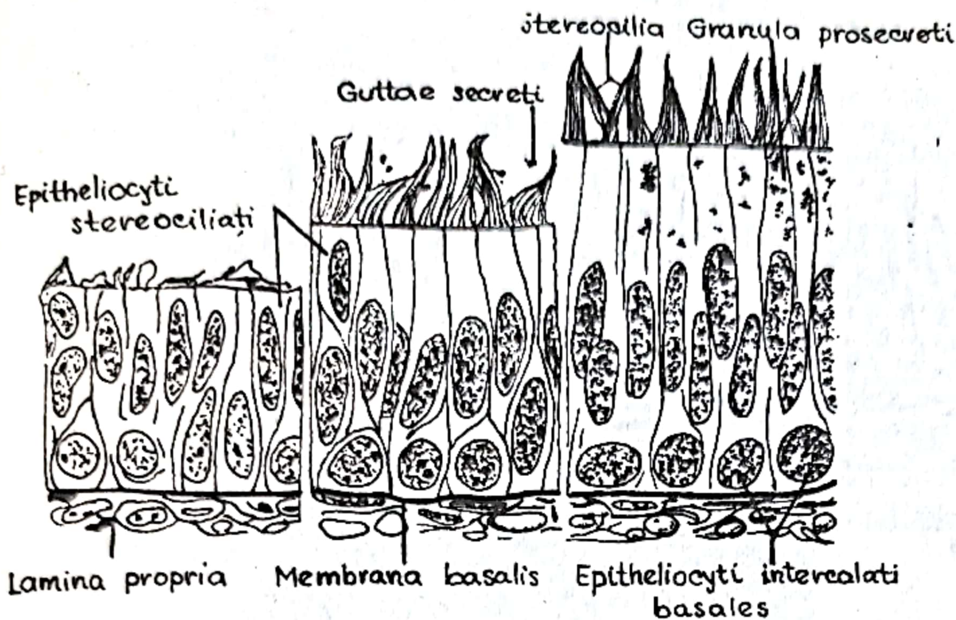


Fig. 37. Stereocilii epiteliului epididimar în microscopia fotonică.

La microscopul fotonic apar sub forma unor prelungiri fine, perpendiculare pe suprafaţa apicală a epiteliului mucoasei trompei uterine, La microscopul electronic cilii vibratili sunt formaţi din patru zone:

1. *Tija cilului* are o lungime de 7 - 10 microni şi un diametru de 0,5 microni. Ectoplasma evaginată acoperită de plasmalemă se diferenţiază în două zone:

a. la periferie o zonă puţin densă la fluxul de electroni - hialoplasma;

b. centrul sau complexul filamentos axial (axonema) este format din citoplasmă în care se găsesc 10 perechi (dublete) de microtubi dispuşi în două grupe:

+ 9 dublete periferice;
+ un dublet central.

2. *Zona de tranziţie* prezintă o linie densă numită placă bazală traversată de cele 9 dublete periferice.

3. *Corpusculul bazal* sau kinetosomul are o formă cilindrică a cărui perete este format din 9 triplete de microtubi. Are rol în mişcarea ciliară.

4. *Rădăcina ciliară* are un aspect striat fiind alcătuită din pachete de microfilamente de actină paralele, perpendiculare pe microtubi, care alternează cu zone clare la fluxul de electroni.

Scanned with OKEN Scanner

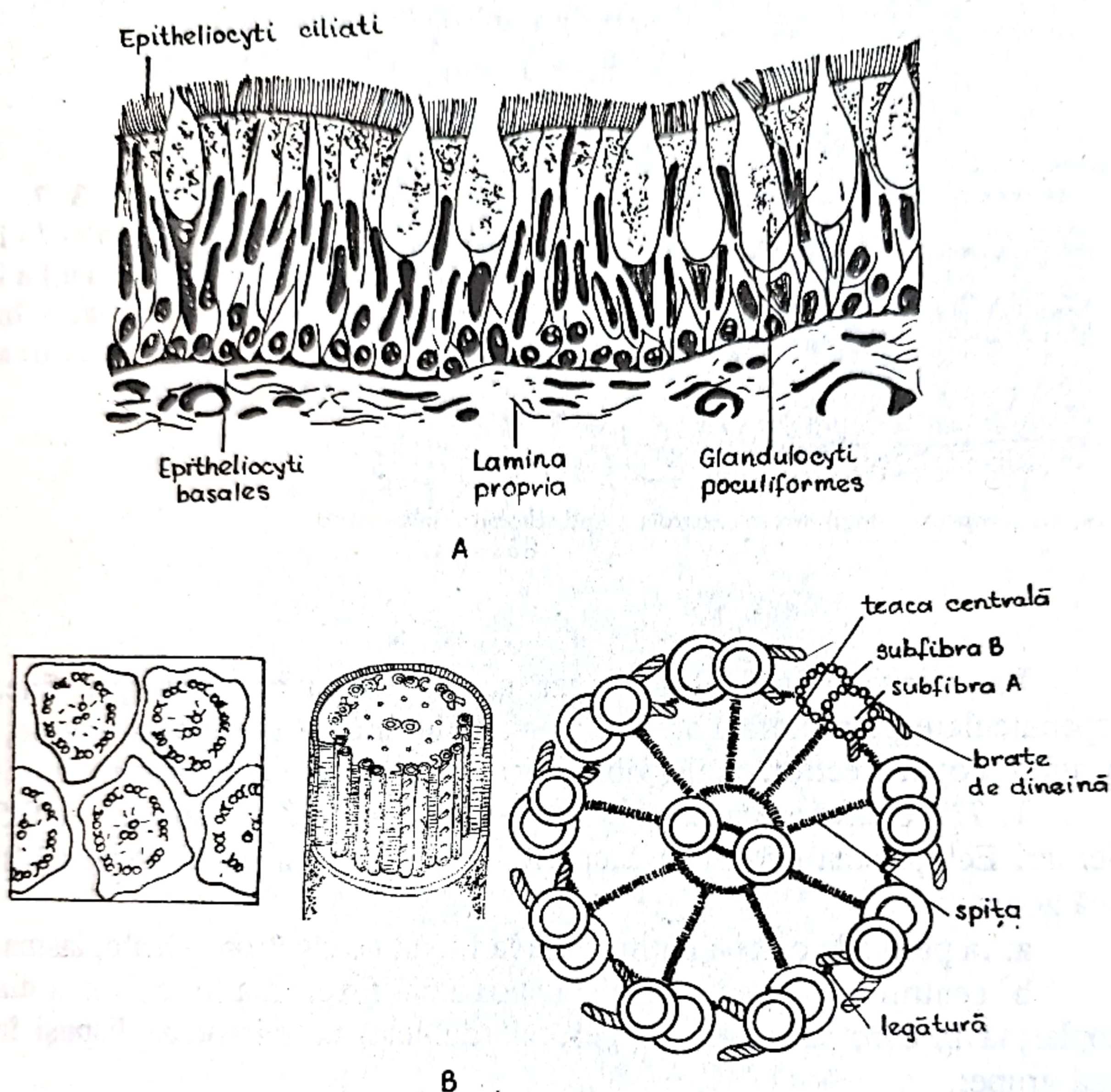


Fig. 38 Cilii vibratili; A - microscopia fotonică (celule epiteliale ale mucoasei traheale); B - ultrastructura cilului vibratil în microscopia electronică.

7.7.2. *Specializările plasmalemei polului bazal*

La unele tipuri de celule epiteliale plasmalema polului bazal care joacă rol în transportul activ al substanţelor se invaginează mai mult sau mai puţin profund în citoplasmă pe care o fragmentează în compartimente mai mult sau mai puţin numeroase, aspect cunoscut sub numele de **labirint bazal**.

Scanned with OKEN Scanner



Fig.39. Aspectul electronomicroscopic al labirintului bazal: mp. - membrana plasmatică; m. - mitocondrii; reg. - reticul endoplasmatic granular.

Nefrocitele tubului contort distal prezintă un labirint bazal bine reprezentat, în citoplasma căruia se găsesc numeroase mitocondrii.

7.7.3. *Zonele de cuplaj celular*

Celulele care intră în alcătuirea organismelor pluricelulare stabilesc între ele legături prin intermediul suprafeţelor lor; acestea îndeplinesc anumite roluri în cadul relaţiilor intercelulare, fiecare din ele având unele particularităţi structurale şi funcţionale.

După structura lor morfofuncţională acestor zone numite şi joncţiuni celulare li se disting trei varietăţi:

+ joncţiuni de adezivitate;
+ joncţuni impermeabile;
+ joncţiuni de comunicare.

Scanned with OKEN Scanner

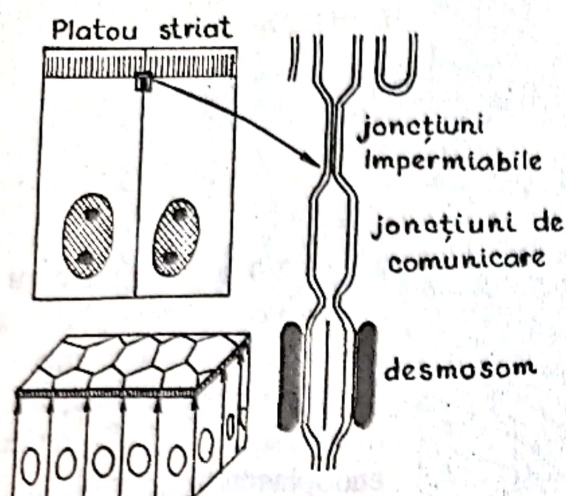


Fig.40. Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de joncţiuni celulare.

7.7.3.1. **Joncţiuni de adezivitate** (desmozomii sau maculae adherens) menţin în contact celulele supuse la forţe mecanice mari şi se găsesc sub două forme:

a. *desmozomii în bandă* sau liniari întâlniţi în zona latero-apicală a epiteliilor sunt formaţi din: agl;omerări de microfilamente de actină dense la fluxul de electroni cu aspectul unei benzi intracitoplasmatice, cele două plasmaleme vecine şi microfibrilele glicoalixului care se întrepătrund.

b. *desmozomii maculari* au o formă ovalară (400 - 500 nm / 190 nm) la formarea cărora iau parte:

+ elemente extracelulare reprezentate de glicolemele celor două celule care se întrepătrund la mijlocul spaţiului intercelular formând linia densă mediană sau lama centrală;

+ elemente celulare reprezentate de cele două plasmaleme cu foiţele interne îngroşate, plăcile citoplasmatice cu aspect lamelar, tonofilamentele şi microfilamentele de actină care unesc cele două plăci citoplasmatice, străbătând plasmalemele şi spaţiul intercelular.

Scanned with OKEN Scanner

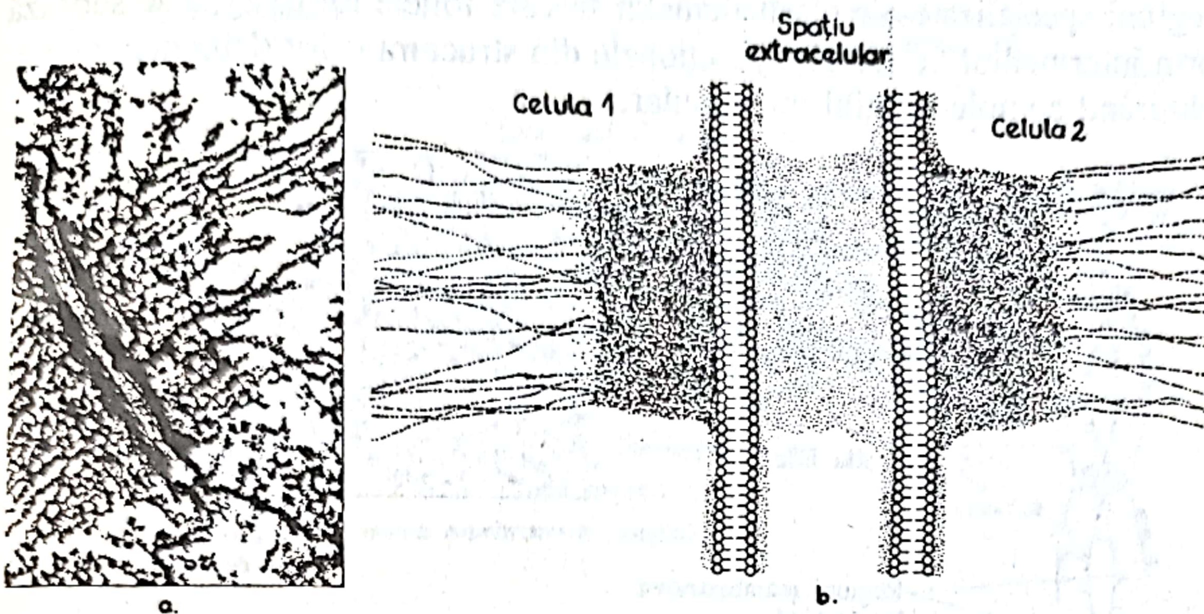


Fig.41. Reprezentarea schematică a unui desmozom.

c. <u>*hemidesmozomii sau desmozomii monocelulari*</u> sunt joncţiuni de adezivitate între polul bazal al celulei şi membrana bazală; în structura lor intră aceleaşi elemente celulare ca şi la desmozomul macular iar ca elemente extracelulare glicoalixul şi fibrilele de ancoraj ale membranei bazale.

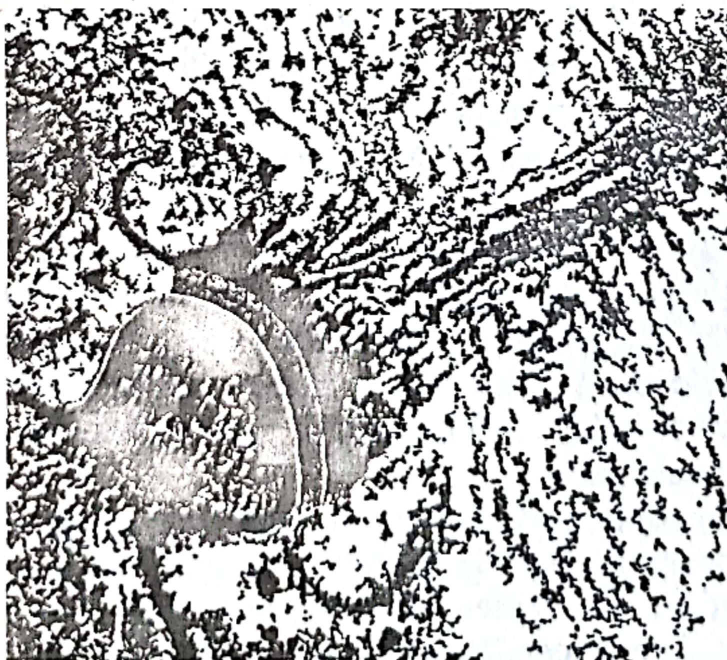


Fig.42. Reprezentarea schematică a unui hemidesmozom.

7.7.3.2. **Joncţiunile impermeabile** (etanşe sau zonula ocludens) sunt regiuni specializate ale plasmalemelor în care foiţele lor externe se sudează prin intermediul proteinelor joncţionale din structura celor două membrane, obturând complet spaţiul intercelular.

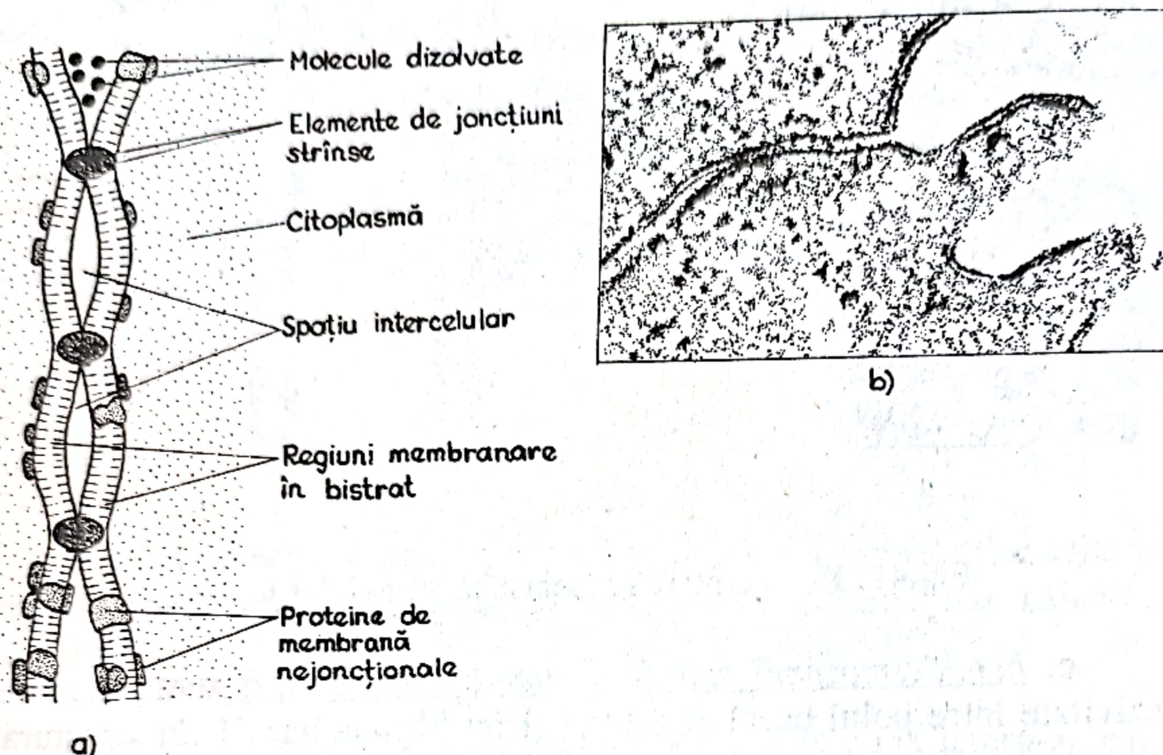


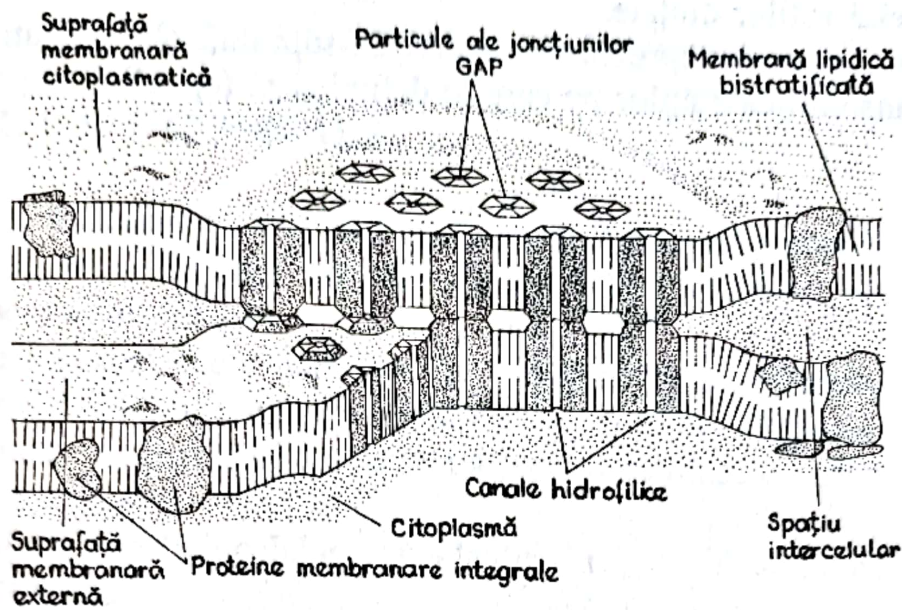
Fig.43. Reprezentarea schematică a unei joncţiuni impermeabile.

La microscopul electronic au un aspect pentalamelar şi se găsesc la toate epiteliile care delimitează o cavitate (epiteliul intestinal, glandular, nefrocite, hepatocite) precum şi la endoteliile din anumite teritorii (celulele endoteliale din creier care participă la formarea barierei hematoencefalice).

7.7.3.3. **Joncţiunile de comunicare** (maculae communicans), permit trecerea unor molecule mici dintr-o celulă în alta; la nivelul lor plasmalemele celor două celule se apropie micşorând foarte mult spaţiul intercelular (2 - 3 nm). Între cele două plasmalemese găsesc nişte canale delimitate de structuri proteice complexe (conexoni) prin intermediul cărora se realizează comunicarea intercelulară.

La microscopul electronic au un aspect heptalamelar şi apar între celulele embrionare în faza de morulă dispărând sau restrângându-se la celulele diferenţiate, la sinapsele electrice, la nivelul discurilor intercalare, la celulele musculare netede, etc.

Scanned with OKEN Scanner




a)


b)

Fig.44. Reprezentarea schematică a unei joncţiuni gap (A); aspect ultrastructural (B)

7.7.3.4. **Interdigitaţiile** reprezintă un aspect particular de cuplaj celular; plasmalemele au un contur sinuos angrenându-se una cu cealaltă

Scanned with OKEN Scanner

după modelul roţilor dinţate.

Interdigitaţiile reprezintă o rezervă de suprafaţă celulară utilizabilă în cazul expansiunii cavităţilor pe care le delimitează (epiteliul vaginal).

Scanned with OKEN Scanner

VIII. STUDIUL NUCLEULUI ÎN INTERFAZĂ

8.1. DATE GENERALE

Prin definiţie, nucleul este o structură intracitoplasmatică limitat de învelişul nuclear. Prezenţa sa este caracteristică celulelor eucariote (cu excepţia hematiilor adulte).

Nucleul este locul unde se află memoria genetică necesară vieţii şi proceselor de diferenţiere şi de multiplicare celulară. Expresia organizării fundamentale a materiei vii o reprezintă legătura strânsă dintre A.D.N. - ul nuclear şi citoplasmă.

Într-un ciclu celular, nucleului i se descriu două stări morfofuncţionale:

a. starea metabolică (interfazică) în care se desfăşoară procese de sinteză care pregătesc diviziunea celulară;

b. starea mitotică.

8.2. FORMA ŞI POZIŢIA NUCLEULUI

În mod obişnuit forma nucleilor este asemănătoare cu cea a celulelor în care se găsesc. Ei pot fi:

1. *sferici* în celule sferice (ovocit), cubice (tireocit), etc.
2. *ovalară* în celule prismatice ale epiteliului intestinal, etc.
3. *bastonaş sau fusiform* în celulele musculare striate, etc.
4. *polilobat* în leucocite mature (granulocitele au nucleii formaţi din 2-5 lobi uniţi prin punţi subţiri).

Conturul nuclear depinde de starea funcţională a celulei, este neregulat în celulele secretorii aflate în plin proces de sinteză sau în fibrele musculare aflate în contracţie.

În general, nucleul ocupă o poziţie centrală, poziţie care poate fi modificată de anumiţi factori:

\+ acumularea de granule de secreţie (în celulele glandulare cu secreţie exocrină nucleul este dispus bazal);

\+ acumularea de substanţe de rezervă (în adipocit nucleul este împins la periferia celulei şi capătă formă de disc).



Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

8.3. DIMENSIUNILE NUCLEILOR

Talia şi volumul nuclear variază de la un tip de celulă la altul în funcţie de specie şi de vârstă, cu fazele ciclului celular.

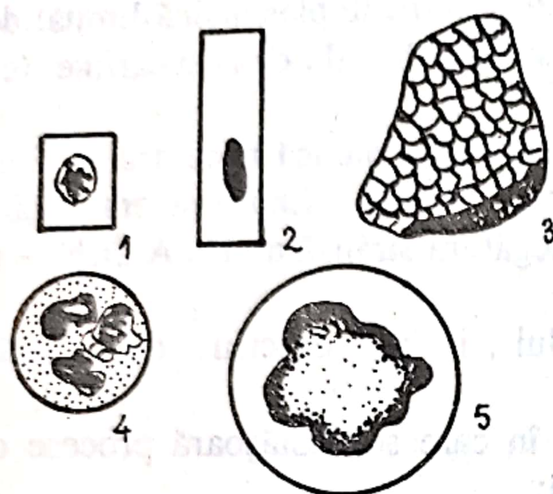


Fig.45. Diferite forme de nuclei. 1-sferic-celulă cubică; 2-ovalar-celulă prismatică; 3-turtit-celulă grasă; 4-lobat-polimorfonuclear.

Dimensiunile la specia umană variază în general în limite foarte largi: 3 - 25 microni. În celulele granulare din scoarţa cerebeloasă diametrul nucleului nu depăşeşte 2 - 3 microni, nucleul spermatozoidului are 4 microni iar ovulul are un nucleu de 20 - 25 microni.

O importanţă deosebită se acordă raportului nucleo- citoplasmatic (N/P) a cărui valori normale sunt cuprinse între 1/3 şi 1/20. Acest raport este cu atât mai mare cu cât celula este mai tânără, mai activă (celulele embrionare) şi invers la celulele adulte în repaos, îmbătrânite. El poate fi calculat cu ajutorul indicelui nucleo-plasmatic.

$$NP = \frac{v_n}{v_c - v_n} = 1/3 - 1/20$$

v_n = volumul nuclear; v_c = volumul celulei

În cazul în care volumul celulei creşte mai mult decât volumul nucleului, raportul nucleo-plasmatic se va reface printr-o diviziune celulară sau printr-o creştere a volumului nuclear.

8.4. NUMĂRUL NUCLEILOR

Marea majoritate a celulelor organismului uman au un singur nucleu - **mononucleate**. Fac excepţie eritrocitele adulte care au pierdut nucleul în

vederea adaptării la funcţia de transport al oxigenului - **anucleate**.

La unele tipuri celulare cu activitate mai intensă există doi nuclei - **binucleate** - ca de exemplu în unii neuroni din ganglionii simpatici, în hepatocite.

Unele celule conţin în citoplasma lor mai mulţi nuclei - multinucleate - ca de exemplu osteoclastul, etc. După modul lor de formare, celulele **multinucleate** se clasifică în plasmodii şi sinciţii.

+ **plasmodiul** provine dintr-o celulă iniţial mononucleată în care au loc mai multe diviziuni celulare neînsoţite însă şi de citodiereză (celula musculară striată, osteoclastul);

+ **sinciţiul** rezultă din contopirea mai multor celule mononucleate într-o formă comună (sinciţiul trofoblastic de la suprafaţa vilozităţilor placentare).

Creşterea numărului de nuclei într-o celulă poate fi corelată cu o creştere a activităţii metabolice (hepatocit) sau cu o necesitate a creşterii informaţiei genetice în vederea sintezei proteinelor (celula musculară striată).;

8.5. STRUCTURA MORFOLOGICĂ A NUCLEULUI

Atât în microscopia fotonică cât şi în cea electronică nucleul apare format din: înveliş nuclear, cromatină, nucleoli şi nucleoplasma.

8.5.1. ***În microscopia fotonică cu contrast de fază*** nucleul interfazic în celula vie apare sub forma unui mic organit, veziculor, omogen, mai refringent decât citoplasma înconjurătoare. La exterior este delimitat de o membrană extensibilă, refringentă, fină dar bine vizibilă. În interior se observă 1 - 2 corpusculi foarte refringenţi - nucleolii. Se pot observa mişcările nucleolilor în carioplasmă şi a nucleilor în citoplasmă.

Examinarea la microscopul fotonic obişnuit a preparatelor fixate şi colorate cu hematoxilină - eozina, evidenţiază o structură nucleară mai complexă:

+ **membrana nucleară** apare sub forma unei linii fine care separă conţinutul nuclear de cel citoplasmic (ceea ce se consideră a fi membrană nucleară nu este altceva decât o condensare periferică a cromatinei numită **membrană cromatică**);

+ o reţea filamentoasă şi granulară constituind cromatina; se distinge o **eucromatină** care corespunde regiunilor slab colorate cu hematoxilină şi o **heterocromatină** intens bazofilă sub forma unor granule mai mari sau mai mici;



Fig.46 .Diferite aspecte ale cromatinei. 1 - cromatină fin granulară, eucromatină; 2 - cromatină în bulgări, heterocromatină; 3 - cromatină în reţea.

+ unul sau doi corpusculi sferici, foarte bazofili reprezentând **nucleolii**;

+ cromatina şi nucleolii se găsesc în sucul nuclear sau nucleoplasma, clară şi omogenă.

Prin utilizarea colorării cu o soluţie de thionină la p.H 5,7 se poate pune în evidenţă prezenţa în nucleii celulelor somatice de la femeie a unui corpuscul colorat în bleu închis, de formă discoidală ataşat membranei nucleare sau semilunară araşat de nucleol, numit **corpusculul Barr** reprezentând condensarea interfazică a unui gonosom (cromozom sexual) X.

În 1970, Person, utilizând tehnica cu fluorocrom pentru identificarea cromozomilor a pus în evidenţă în nucleii celulelor somatice de la bărbaţii normali, a unui corpuscul numit F, corespunzând condensării interfazice a gonosomului Y.

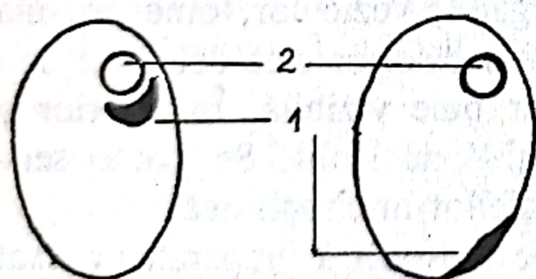


Fig.47. Localizările cromatinei sexuale; 1 - corpusculul Barr; 2 - nucleolul.
Reacţia citochimică Brachet (verde de metil - pyronină) colorează cromatina în verde (A.D.N. - ul) iar nucleolul în roşu (A.R.N.).

8.5.2. *În microscopia electronică*

8.5.2.1. **Învelişul nuclear** apare constituit din două membrane trilamelate separate printr-un spaţiu clar - **cisterna sau spaţiul perinuclear** cu o grosime de 10-15 nm; cele două foiţe, **internă şi externă** au o grosime de 7,5 - 10 nm.

Membrana externă se continuă cu membranele reticulului

endoplasmatic granular (R.E.G.) şi pe faţa citoplasmatică are ataşaţi ribozomi.

În numeroase puncte învelişul nuclear este străbătut de canale - **porii nucleari** - prin care se realizează pasajul macromolecular - nivel la care membrana externă se continuă cu cea internă.

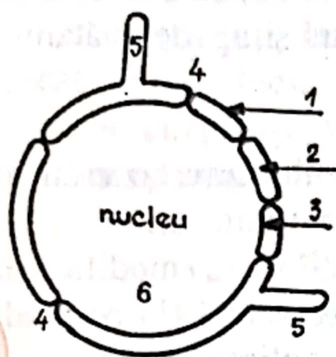


Fig.48. Reprezentarea schematică a învelişului nuclear. 1-membrana externă; 2-cisterna perinucleară; 3-membrana internă; 4-porii nucleari; 5-reticul endoplasmatic; 6-spaţiul intranuclear.

La microscoapele electronice (TEM) cu înaltă rezoluţie porii nucleari apar ca structuri complexe formaţi din:

+ **materialul inelar** reprezentat de 16 particule sferice despuse câte 8 pe conturul fiecărei deschideri a porului, dându-i o formă octogonală (granule inelare).

+ **diafragma** sub forma unor conuri de material dens, amorf, care se inseră pe conturul porului şi se dirijează către centru;

+ **granula centrală,** inconstantă, ocupă centrul porului;

+ **materialul fibrilar** este format din 8 pachete de microfilamente care se inseră pe granulele inelare interne dirijându-se către interiorul nucleului.

Prin intermediul porilor se realizează schimburile nucleoplasmatice de macromolecule.

Lamina densă internă cu o grosime de 20 - 60 nm este o zonă fin granulară sau fibrilară situată pe faţa endonucleară a membranei interne (întreruptă la nivelul porilor) cu rol de suport mecanic.

Lamelele inelare sunt formate din membrane perechi dispuse concentric, în citoplasmă şi în faţa porilor; ele sunt prezente în special în celulele care cresc şi se diferenţiază rapid (celula embrionară). Aceste două ultime formaţiuni sunt cunoscute sub numele de structuri asociate învelişului nuclear.

8.5.2.2. **Cromatina** se prezintă ca un agregat heterogen de granule şi filamente fine, condensate uneori sub forma unor granule mai mari sau

Scanned with OKEN Scanner

cromecentre.

Heterocromatina corespunde unei forme condensate localizată la periferia (membrana cromatică) sau în interiorul nucleului;

Eucromatina corespunde unei forme dispersate, fin granulare situată între cromocentre; este cromatina biologic activă. La microscoapele electronice (TEM) de înaltă rezoluţie se poate observa că unitatea structurală a cromatinei este fibra cromatiniană cu aspectul unui şirag de mătănii - nucleosomi - alcătuită din A.D.N. şi histone.

8.5.2.3. **Nucleolul** este un component al nucleului interfazic cu rol în sinteze A.R.N.-ului ribosomal, care dispare în timpul mitozei. Raportul dintre volumul nucleului şi nucleolului (N/n) se modifică în favoarea nucleolilor în cazul în care celula devine hiperactivă (în perioada sintezei proteinelor de structură sau a proteinelor metabolice).

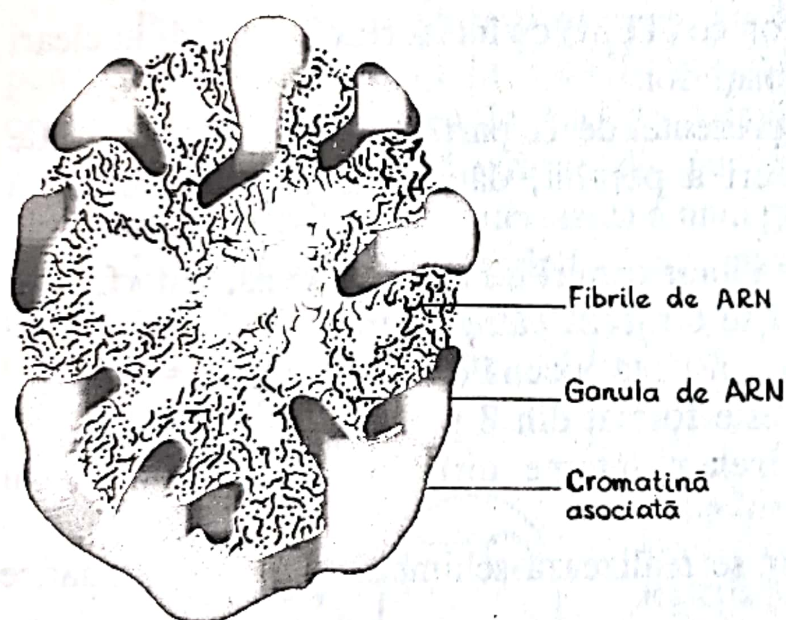


Fig.49. Ultrastructura nucleolului.

Din punct de vedere ultrastructural, nucleolul este format din:

+ **componenta fibrilară** alcătuită din filamente grupate în pachete;

+ **componenta granulară** este structura cea mai bine reprezentată, este alcătuită din granule cu diametrul de 15nm;

+ **componenta cromosomială** formată din fibre cromatiniene dispuse în special la periferia nucleolului;

+ **matricea** sau componenta astructurată, umple spaţiile dintre primele trei structuri nucleolare.

8.5.2.4. **Spaţiile intercromatiniene** delimitate de cele trei

componente ale nucleului (înveliş nuclear, cromatină şi nucleol) pot conţine următoarele ultrastructuri.

+ **fibrile pericromatice** cu un diametru de 3 - 5 nm dispune la periferia cromatinei (precursor al A.R.N. m.).

+ **granule pericromatice** cu un diametru de 25 - 40 nm (A.R.N.m + A.R.N.r 40S);

+ **granule intercromatice** cu un diametru de 20 nm (A.R.N.m. mascat de proteine);

+ **corpii spiralaţi** sunt agregate sferice de 0,3 - 0,5 microni formaţi din fibre spiralate de ribonucleoproteine al căror rol este încă neclar.

8.6. STRUCTURA BIOCHIMICĂ A NUCLEULUI

Membranele învelişului nuclear au aceiaşi structură ca şi celelalte endomembrane. Cromatina este un complex nucleroproteic bogat în A.D.N.; nucleolul conţine A.R.N. şi A.D.N.

Nucleoplasma conţine A.R.N., proteine bazice (histone), proteine acide, A.T.P. şi enzime necesare autoreplicării şi transcripţiei.

IX. ORGANITELE SINTEZEI ŞI SECREŢIEI CELULARE

Sintezele celulare se derulează la nivelul citoplasmei sub controlul A.D.N.- ului nuclear. Procesele de sinteză şi secreţie se desfăşoară la nivelul următoarelor organite celulare: ribosomii, reticulul endoplasmatic şi complexul Golgi.

9.1. RIBOSOMII

Ribosomii sau corpusculii lui Palade (1953) sunt organite nemembranare submicroscopice formate din ribonucleoproteine (A.R.N.r.) cu rol în precesele de proteogeneză.

Sunt prezenţi în citoplasma tuturor tipurilor celulare sub formă **liberă** (izolaţi sau grupaţi în structuri poliribosomice), sau **ataşaţi** membranelor reticulului endoplasmatic şi de faţa citoplasmatică a învelişului nuclear.

La microscopul fotonic, datorită dimensiunilor mici situate sub limita puterii de rezoluţie, ribosomii nu pot fi observaţi; în celulele în care au loc intense procese de proteogeneză (celulele foliculare din ovar) ribosomii formează zone intens bazofile în citoplasmă. Prin tehnica citochimică Brachet (verde metil pironină), ribosomii se colorează în roşu, reacţie care indică prezenţa A.R.N.-ului.

La **microscopul electronic** (TEM) ei apar sub forma unor granule ovalare sau elipsoidale cu diametrul mare de 20-30nm şi cel mic de 16-17nm, cu un coeficient de sedimentare la eucariote de 80 S (Svedberg).

Tehnica colorării negative pune în evidenţă un şanţ care imparte acest organit în două subunităţi inegale ca dimensiuni şi cu structură morfologică şi biochimică diferită.

+ **subunitate mică** cu coeficientul de sedimentare de 40 S şi

+ **subunitate mare** de 60 S prevăzută cu un canal prin care trece lanţul peptidic sintetizat.

Polisomii sau poliribosomii sunt formaţiuni constituite dintr-o moleculă de A.R.N. mesager pe care se fixează mai mulţi ribosomi (ce vor fi cu atât mai numeroşi cu cât proteina ce trebuie sintetizată va fi mai mare).

Poliribosomii liberi sintetizează proteine de structură iar cei ataşaţi membranelor reticului endoplasmatic sintetizează proteine de export.

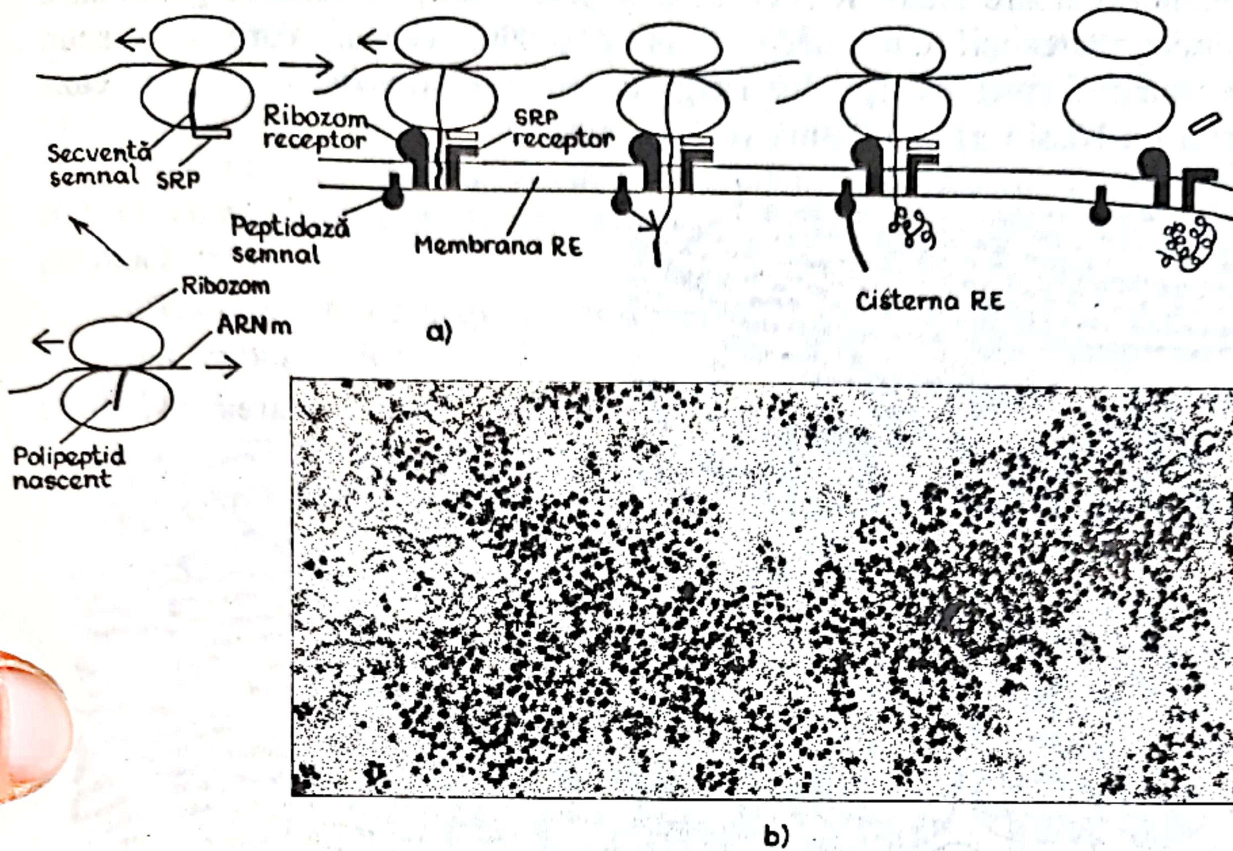


Fig.50. a-schema traducerii ribosomale şi sinteza de proteine; b-poliribosomi.

9.2. RETICULUL ENDOPLASMATIC

Reticulul endoplasmatic este un organit membranar, comun tuturor celulelor, reprezentat sub forma unor canalicule şi cisterne limitate de endomembranare trilamentate cu o grosime de 5-6nm. El îmbracă două forme care comunică una cu cealaltă dar diferă prin structură şi funcţii: reticulul endoplasmatic granular (rugos) şi neted.

9.2.1. ***Reticulul endoplasmatic granular*** reprezintă ansamblul structurilor canaliculare şi veziculare membranare, cu diametrul de 20 nm, pe suprafaţa cărora se găsesc ribosomii ataşaţi prin subunitatea mare; la nivelul lui se sintetizează proteinele de export.

9.2.1.1. **Microscopia fotonică.** R.E.G. este vizibil datorată prezenţei ribosomilor (A.R.N.).

Pe preparate microscopice colorate cu hemalaun picro-indigo-carmin (culoare brună), tricromul lui Ramony Cajal (tentă roşie) metoda Mann-

Scanned with OKEN Scanner

Doninici (culoare bleu), R.E.G. se evidenţiază bine în celulele glandulare (acinii pancreatici, etc.) unde ocupă o poziţie bazală, care se dispun concentric formând corpii lui Berg, în celulele nervoase unde formează corpii lui Nissl (ergastoplasma vechilor autori).



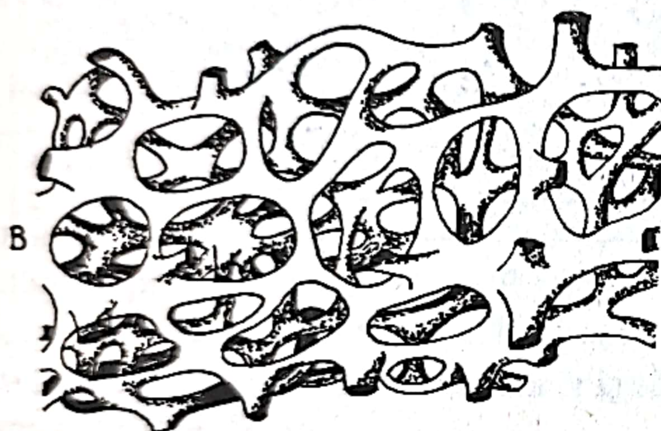


Fig.51. Reprezentarea schemei tridimensionale a reticulului endoplasmatic granular (A) şi neted (B).

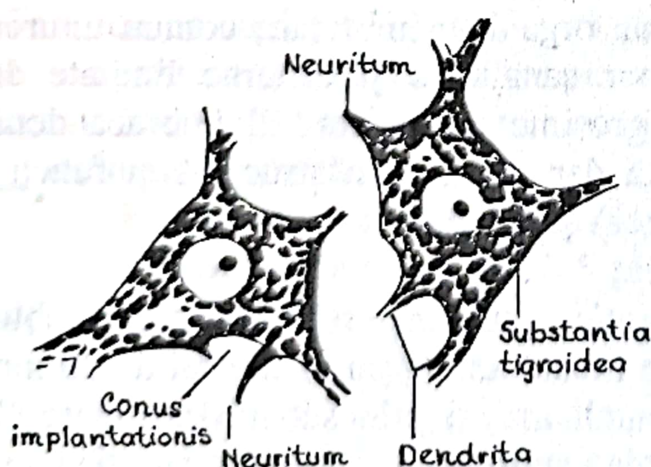


Fig.52. Reticulul endoplasmatic granular (corpusculii Nissl - substanţa tigroidă) în microscopia fotonică.

9.2.1.2. **În microscopia electronică** (TEM) R.E.G. apare sub forma unor saci aplatizaţi sau vezicule a căror membrane trilamelate cu o grosime

de 5-6 nm delimitează un lumen de 5-60nm.

În raport de starea funcţională surprinsă, conţinutul lumenului poate fi omogen şi puţin dens la fluxul de electroni sau heterogen, cu aspect granular.

Pe unele preparate se poate observa continuitatea membranelor R.E.G. cu membrana externă a învelişului nuclear şi a lumenului cu cisterna perinucleară.

Caracteristicile acestei forme de reticul endoplasmatic îl constituie prezenţa ribosomilor pe faţa citoplasmatică a membranelor care-l delimitează.



Fig.53. Reticulul endoplasmatic granular în microscopia electronică.

9.2.2. *Reticulul endoplasmatic neted (R.E.N.).*

Reticulul endoplasmatic neted nu este vizibil pe preparate de microscopie fotonică. În microscopia electronică el apare sub forma unui labirint de canalicule interconectate care comunică cu sacii R.E.G.

Membranele R.E.N. au aceiaşi structură ca şi a membranelor R.E.G. cu deosebirea că din loc în loc prezintă fenestrări asemănătoare porilor nucleari şi pe ele nu se ataşează ribosomi.

R.E.N. este mai bine reprezentat în celulele care sintetizează: hormoni steroizi (glanda suprarenală, celulele interstiţiale din testicul şi ovar), o mare cantitate de glicogen (hepatocitate, miocite) şi în cele care produc pigmenţi (melanocite).

În celula musculară striată, R.E.N. poartă numele de reticul sarcoplasmatic, cu rol de rezervor de Ca şi A.T.P., participând la procesul de cuplare a excitaţiei cu contracţia.

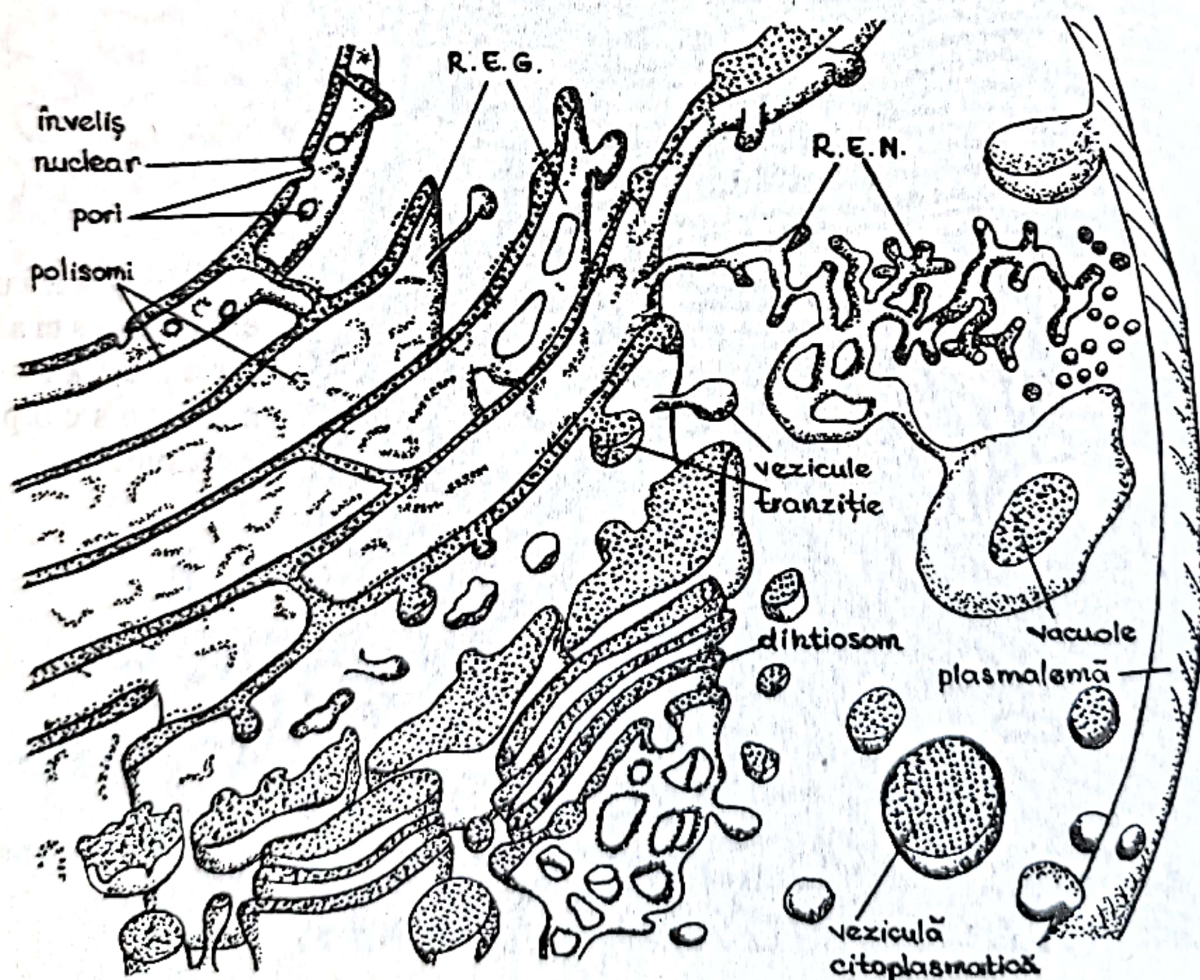


Fig.54. Sistemul endomembranar al celulei.

9.2.3. *Structura moleculară*

În afara elementelor de structură, R.E. conţine multe enzime caracteristice acestui organit.

Majoritatea funcţiilor R.E. se realizează prin intervenţia a două lanţuri transportoare de electroni reprezentate de două flavoproteine (NADH - citocrom - C - reductaza şi NADH- citocrom b5 - reductaza) şi două homoproteine (citocrom b5 şi citocrom P - 450).

Alte enzime ale R.E. sunt: peptidazele, glicozil- transferazele şi hidrolazele care modifică polipeptidele formate în R.E.G. Glucozo-6-fosfataza catalizează degradarea glicogenului din R.E.N.

9.3. COMPLEXUL GOLGI

Complexul Golgi este un sistem intracitoplasmatic de cavităţi limitate de citomembrane, cu suprafaţa netedă, prezent atât în celulele vegetale cât şi animale.

9.3.1. *Structura în microscopia fotonică*

Observarea vitală a complexului Golgi în celulele pancreatice de mamifare se poate realiza fără a recurge la microscopul cu contrast de fază sau interferenţial, cu condiţia utilizării unor obiective mari.

Pe preparatele permanente care conţin celulele specializate în sinteză şi secreţie (celule glandulare) obţinute după prelucrarea cu tetraoxid de osmiu, cobalt, nitrat de argint (Bowen, da Fano, Elftman)- complexul Golgi colorat în negru apare sub forma unei reţele de filamente neregulate situate totdeauna în imediata vecinătate a nucleului.

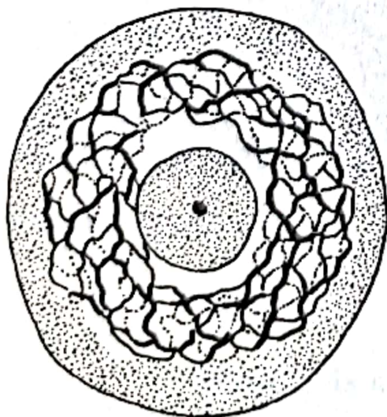


Fig.55. Complexul Golgi în microscopia fotonică.

9.3.2. *Structura în microscopia electronică*

În microscopia electronică complexul Golgi apare sub forma unor unităţi structurale numite dihtiosomi alcătuite din cisterne aplatizate şi vezicule de diferite mărimi, delimitate de membrane lipoproteice, trilamelate, de 6-8nm grosime.

1. *Sacii turtiţi*, dilataţi la extremităţi, se asociază câte 4-8, separaţi prin spaţii de 20nm şi având o dispoziţie paralelă. Fiecare ansamblu de saci golgieni este o structură polarizată prezentând două feţe.

a. *o faţă proximală* sau de formare, convexă, orientată către nucleu şi R.E.

b. *o faţă distală* sau de maturare, concavă, orientată către zona de plasmalemă prin care se vor evacua produşii de secreţie celulară.

2. *Microveziculele* cu un diametru de 20-60 nm şi conţinut heterogen, situate în vecinătatea feţii de formare.

3. *Macroveziculele* cu un diametru de 60-200nm şi conţinut amorf sau granular, vin în raport cu faţa de maturare a sacilor golgieni.

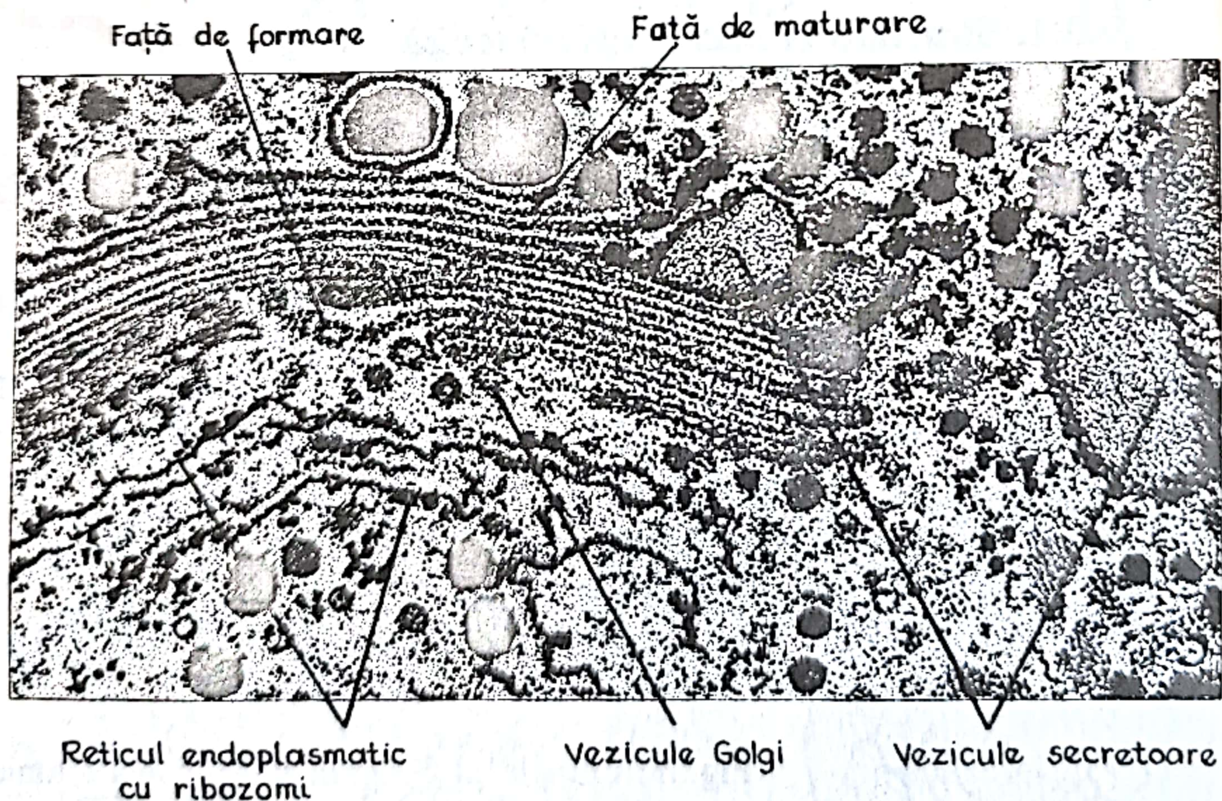


Fig.56. Complexul Golgi în microscopia electronică.

Scanned with OKEN Scanner

9.3.3. *Structura moleculară*

În afara elementelor de structură, fracţiunile Golgi au un echipament enzimatic bogat, din care tiamin - pirofosfataza (T.P.P.) şi nucleozoid - disfosfataza (N.D.P.) reprezintă marcatorii citoenzimologici ai acestui organit. S-au mai detectat sulfotransferaze, glicoziltransferaze, fosfataza acidă, etc.

Complexul Golgi are rol în concentrarea şi transferul proteinelor, sinteza glicolipidelor şi glicoproteinelor, în formarea şi reciclarea membranelor.

X. ORGANITE GENERATOARE DE ENERGIE. MITOCONDRIILE.

Mitocondriile, organite membranare prezente în toate celulele cu metabolism aerob, conţin sisteme enzimatice necesare oxidării materialelor nutritive, sintezei moleculelor de A.T.P - şi cuplajului acestor două procese - fosforilarea oxidativă. Mitocondria este "uzina de putere" care produce energia necesară derulării reacţiilor celulare. Sunt organite semiautonome.

10.1. MICROSCOPIA FOTONICĂ A MITOCONDRIILOR

A. *Microscopia fotonică cu contrast de fază*, mitocondriile apar foarte net în special după coloraţii supravitale cu verde Janus B, negru Janus, albastru de metil, etc.

Se poate constata că sunt dotate cu o mare plasticitate şi o mobilitate cu totul deosebită: mitocondriile se deplasează în masa citoplasmatică, se deformează, dau muguri laterali care se pot detaşa; diametrul şi volumul lor poate creşte sau micşora.

B. *Pe preparatele fixate şi colorate* cu fuxină acidă (tehnica Altman), violet cristal (tehnica Benda), cu lacurile de hematoxilină prin coloraţii regresive, impregnare argentică (tehnica Rio-Hortega), mitocondriile apar sub diverse *forme*, în funcţie de tipul celular:

+ alungită în celulele epiteliale ale pancreasului exocrin,
+ granulară în hepatocite, celulele glandei corticosuprarenale.

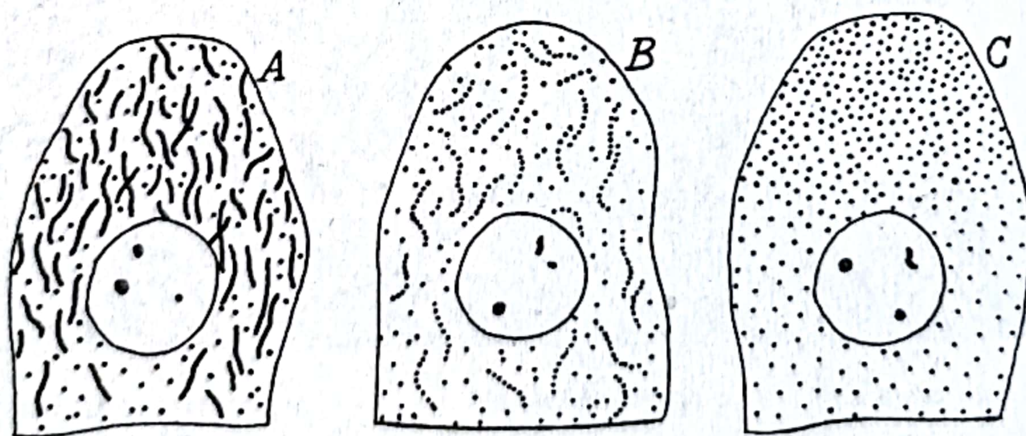


Fig.57. Diferite forme de mitocondrii în microscopia fotonică.

2. **Talia** mitocondriilor este diferită în raport de tipul celular. În hepatocite, nefrocite, ele au o lungime de aproximativ 3 microni şi un diametru de 0,5 - 1 microni; în celulele musculare au o lungime care poate

ajunge la 8 microni iar în celulele epiteliale ale pancreasului exocrin 10 - 12 microni.

3. **Numărul** mitocondriilor dintr-o celulă variază în raport de necesităţile ei energetice; în hepatocite, nefrocite, numărul lor este mare (300 - 2500) faţă de adipocite, limfocite, etc. unde numărul lor este redus.

4. **Distribuţia** lor în citoplasmă nu este fixă, ele migrând spre regiunile în care celula are mai multă nevoie de energie: perinuclear, în vecinătatea plasmalemei, lângă R.E.G.

În nefrocitele tubulilor contorţi distali ele ocupă labirintul bazal, energia eliberată fiind utilizată de plasmalema polului bazal, în vederea efectuării unui transport activ de substanţe.

În celulele ciliate (epiteliul mucoasei trompei uterine) mitocondriile se găsesc în apropierea corpusculului bazal - centrul cinetic al cilului.

La nivelul celulelor cu dublă polaritate (hepatocite, enterocite) mitocondriile se aglomerează la cei doi poli.

10.2. ULTRASTRUCTURA MITOCONDRIILOR

La TEM, mitocondriile apar sub o formă sferică sau alungită, formate din două sisteme membranare, trilamelate: **membrana externă** şi **membrana internă** care trimite în interior prelungiri digitiforme sau **creste mitocondriale.** Fiecare membrană are o grosime de 6 - 8 nm şi structura lor este asemănătoare cu cea a altor citomembrane.

Spaţiul dintre două membrane numit **camera externă** sau spaţiul intermembranar este ocupat de un material amorf, puţin dens la fluxul de electroni.

Camera internă sau matricea mitocondrială, delimitată de membrana internă şi compartimentată de crestele mitocondriale, este ocupată de un material fin granular în care se pot observa uneori granule cu un diametru de 3 - 5 nm (granule intramitocondriale care reprezintă locurile de fixare a cationilor bivalenţi în special Ca^{2+} şi Mg^{2+}); este mai densă la fluxul de electroni decât camera externă.

Prin tehnicile colorării negative s-a constatat că membrana internă este formată din particule elementare (F1) sau unităţi tripartite alcătuite din:

+ un **cap** sferic cu diametrul de 9 nm care pătrunde în matricea mitocondrială;

+ o **tijă** cilindrică cu lungimea de 5 nm şi diametrul de 3,5 nm;

+ o **bază** patrulateră cu latura de 14 nm şi grosimea de 4,5 - 5 nm.

Scanned with OKEN Scanner

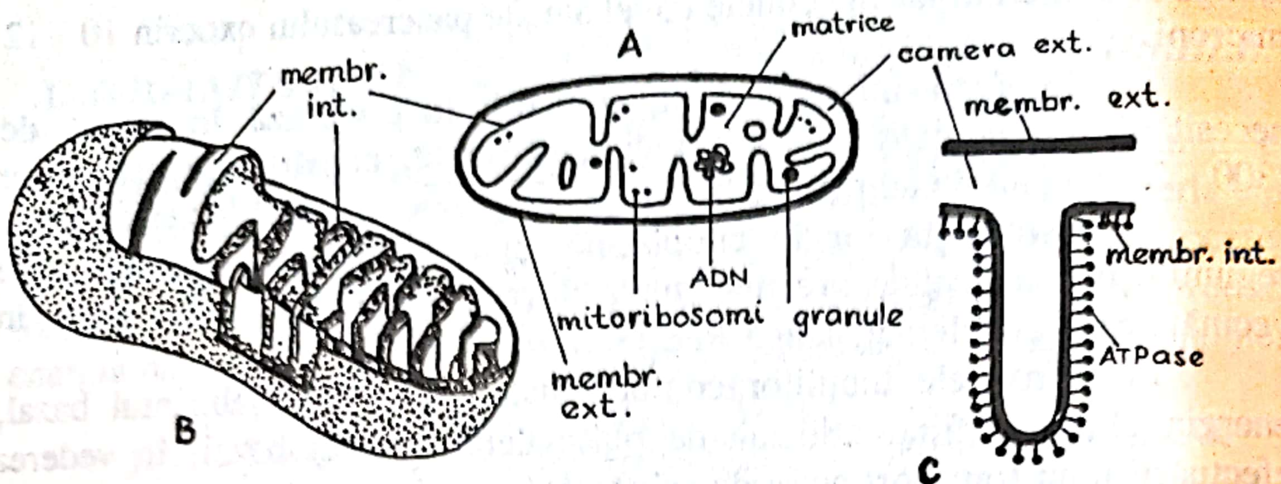


Fig.58. Reprezentarea schematică a ultrastructurii mitocondriale.



Fig.59. Ultrastructura mitocondriei.

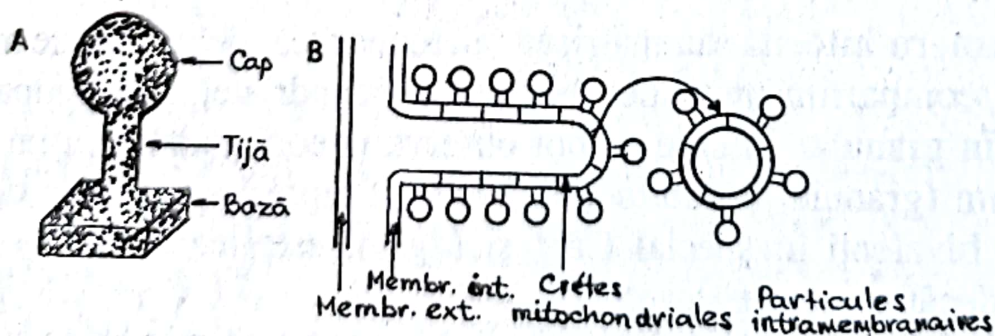


Fig.60. Unităţile tripartite ale membranei interne mitocondriale.

10.3. STRUCTURA MOLECULARĂ

În afara elementelor de structură, mitocondriile conţin un bogat

Scanned with OKEN Scanner

echipament enzimatic. Dintre acestea:

+ **membrana externă** conţine monoamin - axidaza (marker);

+ **membrana internă** - enzime ale lanţului respirator (citocrom - C - oxidaza - marker) şi ale fosforilării (F1 - A.T.P. - aza);

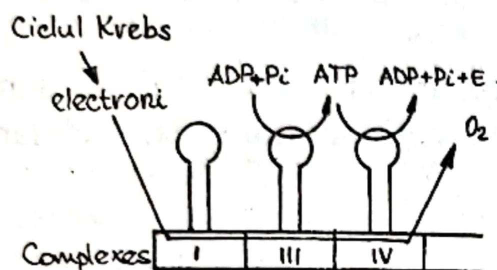


Fig.61. Funcţiile unităţii tripantite.

+ **camera externă** - adenilat - kinaza;

+ **camera internă** - conţine enzimele solubile ale ciclului Krebs şi cele implicate în oxidarea acizilor graşi (malat - dehidrogenaza - enzimă marker).

În matricea mitocondrială se mai găsesc 4 - 5 molecule de A.D.N. mitocondrial cu structură bicatenară dispuse circular ca la bacterii, A.R.N. mitocondrial, enzime care catalizează reacţiile de autoreplicare, transcripţie, proteogeneză şi ioni de Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, etc.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

XI. ORGANITELE DIGESTIEI CELULARE

Prin digestie celulară se înţelege ansamblul reacţiilor de digerare a moleculelor pătrunse în celulă prin endocitoză, a unor fragmente de celulă sau a unor structuri tisulare.

Celulele eucariote sunt înzestrate cu organite membranare - lizosomii şi peroxizomii - a căror funcţie principală este digestia intra şi extracelulară.

11.1. LIZOSOMII

Lizosomii sunt organite membranare comune tuturor celulelor care se observă numai în microscopia electronică (cu excepţia lizosomilor de talie mare 0,3 - 1 microni din leucocitele polimorfonucleare care sunt vizibili şi în microscopia fotonică).

Au o formă sferică iar conţinutul este bogat în enzime hidrolazice.

11.1.1. *Structura electronomicroscopică*

La microscopul electronic (T.E.M.) lizosomilor li se descriu:

a. *membrana* trilamelată, cu o grosime de 6 - 8 nm;

b. *matricea* sau miezul lizosomilor poate îmbrăca aspecte diferite; la unii miezul este omogen, fin granular (lizosomi primari) la alţii matricea conţine fragmente de membrane, microbii, etc. (lizosomi secundari).



Fig.62. Lizosomii în microscopia electronică.

După natura materialului înglobat, lizosomii secundari se clasifică în:

1. *heterolizosomi* - rezultă din fuzionarea lizosomilor primari cu fagosomii sau pinosomii (heterofagie);

2. *autolizosomi* - se formează prin fuziunea lizosomilor primari cu vacuole care conţin structuri proprii uzate (resturi endomembrane); procesul digestiv se numeşte autofagie;

3. *crinolizosomi* - rezultă din unirea unui lizozom primar cu o veziculă de secreţie (crinofagie).

4. *corpii multiveziculari* - sunt lizosomi secundari - în care procesele digestive s-au terminat; în interiorul lor se află un număr variabil de microvezicule;



Fig.63. Ultrastructura unui corp multivezicular. 1-membrana lizozomului secundar; 2-matrice; 3-microvezicule; 4-mitocondrii; 5-granule de glicogen.

5. *corpii reziduali* sunt vacuole provenite dintr-un hetero- sau autolizozom în care persistă reziduuri nedigerate de enzimele lizozomale (figurile mielinice).

11.1.2. ***Structura moleculară***.

Pe lângă elementele de structură, lizosomii conţin aproximativ 50 de tipuri de enzime hidrolazice acide (activate la p.H 3 - 6), în stare latentă, din care fosfataza acidă este enzima marker.

Ele sunt reprezentate de proteaze, peptidaze, nucleaze (D.N. -ază şi

R.N. - ază), fosfataze, lipaze, esteraze, glucozidaze, etc.

11.2. PEROXISOMII

Peroxisomii sunt organite ultramicroscopice comune tuturor celulelor cu un bogat conţinut de peroxidaze, catalizând reacţia de formare (oxidază) şi de descompunere (catalază) a peroxidului de hidrogen (H_2O_2), compus toxic pentru celulă.

11.2.1. *Ultrastructura peroxisomilor*

Au o formă sferică şi după dimensiuni se clasifică în:
1. peroxisomi propriu-zişi cu un diametru de 0,5 - 1,5 nm;
2. microperoxisomi cu diametru de 0,2 - 0,4 nm;

Din punct de vedere morfologic, peroxisomii sunt formaţi din membrană şi matrice iar la nivelul peroxisomilor propriu-zişi se mai adaugă nucleoidul şi placa marginală.



Fig.64. Schema electronomicroscopică a peroxisomilor. P. - peroxisomi; R.E.G. -reticul endoplasmatic rugos; R.E.N. - reticul endoplasmatic neted; M. mitocondrie.

1. *Membrana* are o grosime de 6-8 nm şi un aspect trilamelat;

2. *Matricea* este fin granulată, omogenă, mai densă la fluxul de electroni decât cea a lizosomilor, putând conţine uneori microfilamente ramificate cu diametrul de 4-5,5 nm.

3. *Nucleoidul* se găseşte în peroxisomii celulelor de vertebrate în afară de pasăre şi om; este o structură densă formată din microtubi cu diametrul de 4,5 nm, dispuşi asemănător unui fagure de miere.

4. *Placa marginală* se găseşte în peroxisomii celulelor tuturor speciilor de mamifere; sub formă de lame dense la fluxul de electroni de 8,5 nm grosime.

Aceste două ultime structuri se găsesc în majoritatea tipurilor celulare, mai bine reprezentate în peroxisomii propriu-zişi din fibroblaste,

endotelii, granulocite eozinofile şi în celulele care sintetizează hormoni steroizi.

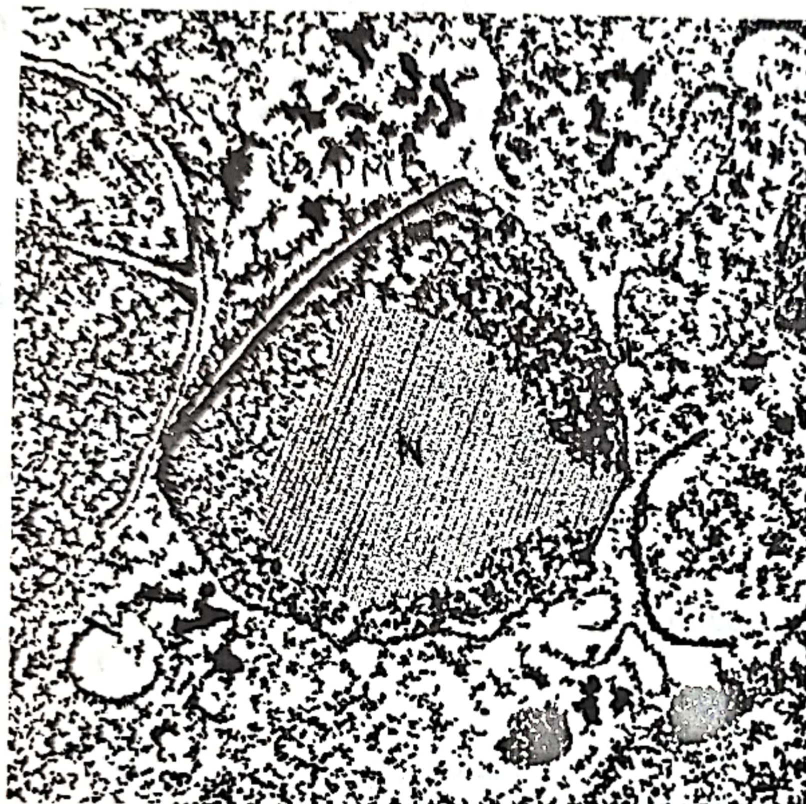


Fig.65. Ultrastructura peroxisomilor cu nucleoid şi placă marginală.

11.2.2. ***Structura moleculară***

Din echipamentul enzimatic al peroxisomilor, catalaza reprezintă enzima marker.

Prin conţinutul lor enzimatic, peroxisomii îndeplinesc următoarele funcţii: respiratorie, în reglarea catabolismului glucozei, în degradarea acidului uric, în producerea unei nici cantităţi de energie şi în metabolismul lipidelor.

Atât lizosomii cât şi peroxisomii sunt implicaţi în apariţia unor manifestări patologice congenitale.

Scanned with OKEN Scanner

XII. ORGANITELE MOTILITĂŢII CELULARE.

Toate mişcările celulare se realizează prin intervenţia elementelor citoscheletale. Există diferite categorii de mişcare.

1. Mişcări provocate de contracţia musculară: actină - miozină
2. Mişcări care modifică raportul celulă - mediu extern:
   a. mişcarea ameboidă actină - miozină
   b. mişcarea prin flageli dineină - tubulină
   c. mişcarea ciliară dineină - tubulină
3. Mişcări care nu modifică raportul celulă - mediu extern:
   a. mişcările din endo şi exocitoză actină - miozină
   b. mişcările din cursul diviziunii celulare actină- miozină dineină - tubulină

Cele două sisteme moleculare: actină miozină şi dineină - tubulină care stau la baza mobilităţii celulare formează trei structuri:citoschelet.

1. microfilamente de actină;
2. microtubi;
3. centrioli.

12.1. MICROFILAMENTE

Microfilamentele sunt structuri fibrilare cu un diametru de aproximativ 7nm şi lungimi variabile, alcătuite din proteine contractile (actină), vizibile numai în microscopia electronică.

În celulele nemusculare microfilamentele se găsesc fie în toată matricea, fie numai în ectoplasmă; ele pot fi izolate sau grupate (în microvilii, desmozomi în bandă, rădăcini ciliare).

Microfilamentele din ectoplasmă se ancorează la faţa profundă a plasmalemei prin alfa-actinină.

În celula nervoasă există complexe filamentoase numite **neuorofibrile**. În microscopia fotonică, neurofibrilele se pot pune în evidenţă prin tehnici speciale (Carey - cu aur, Gros - Schultze - azotat de argint); ele ocupă atât corpul celulei (pericarion) cât şi prelungirile axonice şi dendridice. La microscopul electronic, neurofibrilele sunt alcătuite din neurofilamente.

În celulele epiteliale ale epidermului, examinate la microscopul fotonic prin colorarea cu hemalaun - roşu de Congo, se pot observa filamente de keratină cu dispoziţie ordonată sau neorientate numite

tonofibrile (keratina se colorează în roşu închis).

La microscopul electronic, tonofibrilele sunt formate din tonofilamente izolate sau grupate.

12.2. MICROTUBII

Microtubii sunt structuri tubulare cu un diametru de 25 nm şi un ax clar de aproximativ 15 nm şi lungimi variabile. Peretele lor este format din 13 protofilamente paralele formate prin polimerizarea unor heterodimere de tubulină alfa şi beta, dispuse helicoidal, cu înclinaţie de 10 - 25 grade.

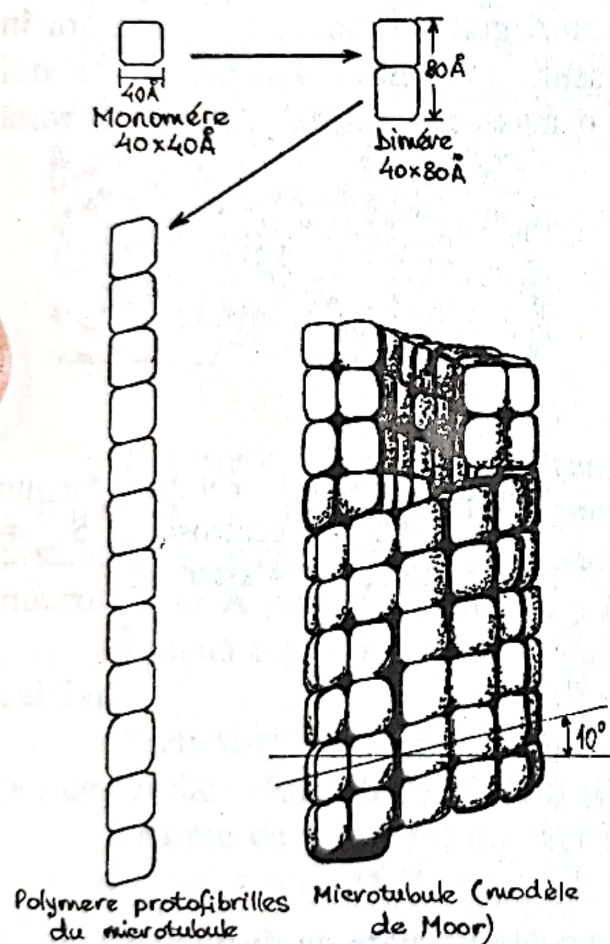


Fig.66. Reprezentarea tridimensională a unui microtub arătând dispoziţia subunităţilor care îl formează.

Stabilitatea microtubilor variază în funcţie de structurile pe care le edifică; astfel, microtubii liberi din citosol, din aster şi fusul de diviziune sunt **formaţiuni labile** (asamblare şi dezasamblare) pe când complexele de microtubi din axoneme, centrioli şi corpusculi bazali sunt **elemente stabile**.

Utilizarea unor tehnici de imunocitochimie care folosesc antitubulina, permit vizualizarea microtubilor în microscopia fotonică.

Microtubii îndeplinesc următoarele roluri: menţin forma celulară, ghidarea mişcării diferitelor componente celulare, construiesc fusul mitotic, se asociază formând centriolii, axul ciliar şi flagelii.

12.3. CENTRUL CELULAR

Centrosomul sau centrul celular este un organit nemembranar prezent în toate celulele care se divid.

12.3.1. În **microscopia fotonică** prezintă aspecte diferite în raport de faza ciclului celular.

În interfază are forma unei structuri granulare numită **centrosom** în interiorul căruia se află 1 - 2 corpusculi sau **centrioli** (asocierea a doi centrioli = diplosom), înconjurată de o masă citoplasmatică densă numită **centrosferă**.

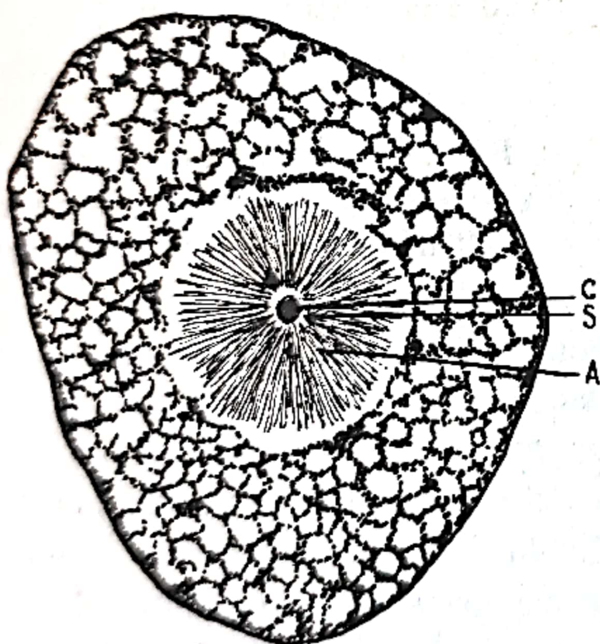


Fig.67. Centrul celular într-un ovocit. C. = centrosom; S. = centrosferă; A. = aster.

Din centrosferă se detaşează elemente fibrilare cu dispoziţie radiară formând **asterul**.

Ansamblul centrosferă - aster se numeşte **astrosferă**. Punerea în evidenţă a centrului celular se realizează cu tehnica lui Fleming(tripla colorare cu safranină - violet de genţiană - orange G).

12.3.2. În ***microscopia electronică*** elementul distinct este **centriolul** care apare sub forma unui cilindru cu lungimea de 0,35 micrometri şi un

diametru de 0,15 micrometri; peretele este format din 9 grupe a câte 3 microtubi sau triplete.

Fiecare microtub este alcătuit din 13 protofilamente cu un diametru de 25 nm dispuse împrejurul unei cavităţi centrale.

Microtubii fiecărui triplet sunt notaţi cu A, B şi C, tubul intern=A, cel extern=C. Microtubii A şi C de la două triplete vecine sunt uniţi printr-o bandă densă la fluxul de electroni.



Fig.68. Aspectul electronomicroscopic al unui diplosom cu dispoziţia caracteristică a celor doi centrioli.

Fiecare centriol are o extremitate **proximală** orientată spre centrul celulei şi o extremitate **distală** orientată spre periferia ei; centrul extremităţii distale este ocupat de un cilindru electronodens unit de faţa internă a microtubilor A prin 9 linii dense.

Într-un diplosom, cei doi centrioli sunt aşezaţi perpendicular unul pe celălalt.

Structurile asociate centriolilor sunt reprezentate de: sateliţii pericentriolari (formaţiuni sferice) şi microtubi.

Înainte de începutul mitozei centriolii se duplică şi fiecare din cele două perechi migrează în cursul diviziunii la polii opuşi ai celulei (ciclul centriolar).

12.4. INCLUZIUNILE CELULARE

În hialoplasmă se pot găsi incluziuni celulare care reprezintă produse ale activităţii celulare, sub forma substanţelor de rezervă sau deşeuri de metabolism.

Spre deosebire de organitele celulare care au un caracter permanent, incluziunile sunt temporare.

Incluziunile pot fi formate din:

12.4.1. ***Substanțe proteice***. Dintre acestea amintim hemoglobina care este o proteină cu activitate respiratorie (hemocianina, o altă proteină cu rol respirator, se evidențiază în citoplasma celulelor sanghine de la numeroase moluşte şi artropode sub forma unor cristale voluminoase).



Fig.69. Evidențierea glicogenului (PAS) în hepatocite.

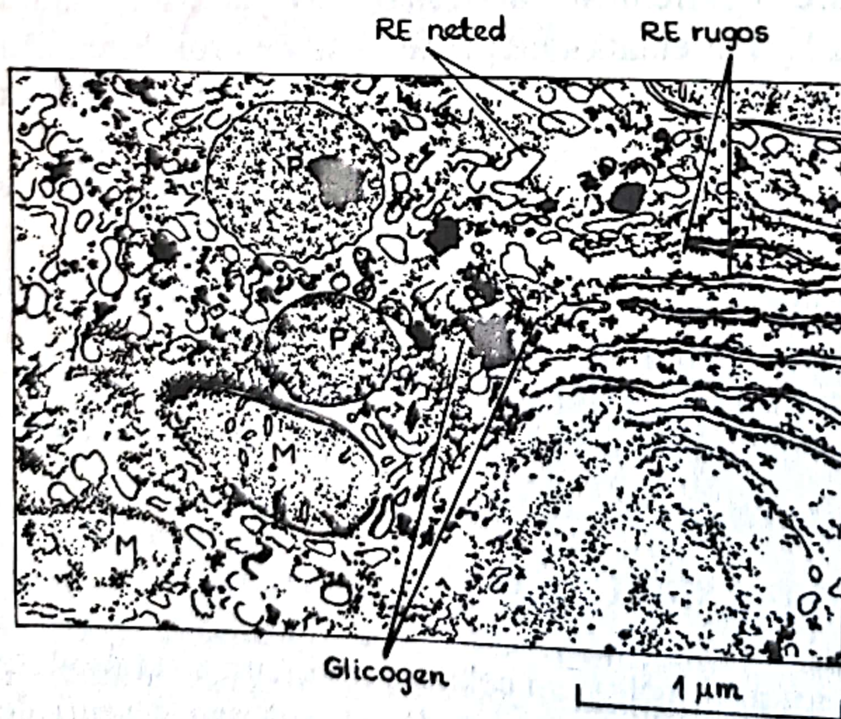


Fig.70. Glicogenul în microscopia electronică.

Scanned with OKEN Scanner

12.4.2. ***Lipidele*** apar la microscopul fotonic sub forma unor picături sferice evidenţiate cu coloranţi specifici de tipul Sudanului sau OsO4 în hepatocite, celulele corticosuprarenalei şi corpului galben din ovar. La microscopul electronic, acumulările de grăsimi au forme ovalare sau sferice, de diferite mărimi.

12.4.3. ***Glicogenul*** evidenţiat cu carmin Best sau P.A.S. apare în microscopia fotonică sub forma unor granule sau plaje de diferite mărimi, în special în hepatocite şi celulele musculare.

În microscopia electronică apar sub forma unor rozete de glicogen cu diametrul de 15 - 30 nm, asociate frecvent reticulului endoplasmatic neted.

12.4.4. ***Substanţe minerale*** reprezentate de fier, siliciu - evidenţiate prin tehnici de citochimie.

Scanned with OKEN Scanner

Incluziunile pot fi formate din:

12.4.1. ***Substanţe proteice***. Dintre acestea amintim hemoglobina care este o proteină cu activitate respiratorie (hemocianina, o altă proteină cu rol respirator, se evidenţiază în citoplasma celulelor sanghine de la numeroase moluşte şi artropode sub forma unor cristale voluminoase).



Fig.69. Evidenţierea glicogenului (PAS) în hepatocite.

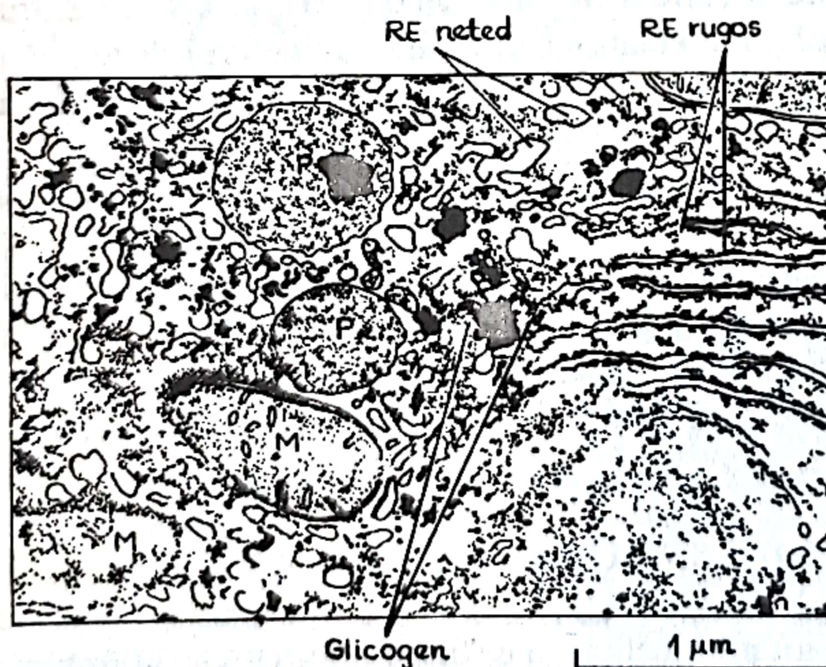


Fig.70. Glicogenul în microscopia electronică.

Scanned with OKEN Scanner

12.4.2. ***Lipidele*** apar la microscopul fotonic sub forma unor picături sferice evidenţiate cu coloranţi specifici de tipul Sudanului sau OsO4 în hepatocite, celulele corticosuprarenalei şi corpului galben din ovar. La microscopul electronic, acumulările de grăsimi au forme ovalare sau sferice, de diferite mărimi.

12.4.3. ***Glicogenul*** evidenţiat cu carmin Best sau P.A.S. apare în microscopia fotonică sub forma unor granule sau plaje de diferite mărimi, în special în hepatocite şi celulele musculare.

În microscopia electronică apar sub forma unor rozete de glicogen cu diametrul de 15 - 30 nm, asociate frecvent reticulului endoplasmatic neted.

12.4.4. ***Substanţe minerale*** reprezentate de fier, siliciu - evidenţiate prin tehnici de citochimie.

Scanned with OKEN Scanner

XIII. DIVIZIUNEA CELULARĂ

Toate celulele organismului uman în afara celor nervoase sunt capabile să se multiplice adică să formeze două celule fiice cu aceleaşi caractere morfologice şi funcţionale ca şi celula mamă (în anumite cazuri, una sau cele două fiice nu seamănă cu celula mamă).

Prin diviziune celulară se realizează un proces de diferenţiere şi creştere, de menţinere a structurii şi funcţiilor organismelor precum şi reproducerea lor.

La om, multiplicarea celulară se face prin:

a. diviziune indirectă, cariochineză sau mitoză;

b. diviziune directă sau amitoză (în unele situaţii).

13.1. METODE DE STUDIU

Evenimentele care caracterizează multiplicarea sunt studiate prin tehnici variate care pun în evidenţă structuri sau edificii moleculare apărute în această etapă a ciclului celular.

13.1.1. *Observarea în microscopia fotonică*

Celulele pot fi observate fie în vivo (culturi de celule) fie pe secţiuni, după fixare, cu ajutorul microscopului fotonic obişnuit, cu contrast de fază, cu fluorescenţă, etc.

Observarea in vivo permite înregistrarea mişcărilor celulare prin microcinematografie ceea ce aduce o contribuţie importantă la studiul diviziunii pe plan dinamic.

13.1.2. Observarea în ***microscopia electronică*** (TEM) permite identificarea structurilor nucleare şi citoplasmatice care participă la mitoză: microtubii fusului de diviziune, microfilamente, ciclului centriolar, cromozomii, etc.

13.1.3. ***Utilizarea antimitoticilor*** de tipul colchicinei, vinblastinei şi vincristinei care inhibă polimerizarea dimerelor de tubulină, permit studiul optic al fusului de diviziune şi a cromosomilor.

13.1.4. ***Izolarea aparatului mitotic*** se realizează prin stabilizarea aparatului mitotic cu agenţi chimici (glicoli cu lanţ lung sau solvenţi organici) şi înlăturarea altor constituienţi celulari printr-un detergent.

Scanned with OKEN Scanner

Izolarea aparatului mitotic se realizează prin introducerea celulelor (ouăle de arici de mare, moluşte) într-un mediu cu p.H. uşor acid conţinând Triton x 100 (detergent) şi tubuline extrase din creier, Mg^{2+}, A.T.P. sau G.T.P. şi se studiază în microscopia cu lumină polarizată.

13.2. MITOZA

Diviziunea indirectă sau mitoza produce modificări morfologice şi biochimice atât la nivel nuclear cât şi citoplasmatic. Ea prezintă două forme:

a. mitoza somatică sau propriu-zisă (ecuaţională);

b. mitoza reducţională sau meioza.

13.2.1. *Mitoza somatică*

Prin mitoză somatică sau ecuaţională (homeotipică) zestrea genetică maternă se împarte în mod egal între cele două celule fiice (set cromozomal diploid) şi se desfăşoară în patru etape succesive: profaza, metafaza, anafaza şi telofaza.

13.2.1.1. Profaza se caracterizează prin:

a. *în nucleu* apar cromozomii prin spiralizarea fibrelor cromatiniene care migrează către periferia lui; centromerul sau chinetocorul a cărui poziţie este constantă pentru fiecare cromozom, devine vizibil.

b. *în citoplasmă* cei doi centrioli împreună cu procentriolii lor se îndepărtează unul de celălalt, între ei apărând microtubii cu dispoziţie radiară (microtubii asterieni).

Înaintea celei de a doua etape, învelişul nuclear şi nucleolul dispar progresiv iar cromozomii migreză către planul ecuatorial al celulei; chinetocorii sunt mai evidenţi şi devin funcţionali determinând organizarea microtubilor fusului de diviziune (microtubi chinetocorieni).

13.2.1.2 **În metafază** cromozomii se scurtează prin accentuarea spiralizării şi ocupă un plan care corespunde ecuatorului celulei formând **placa ecuatorială**; cromatidele sunt orientate către periferia celulară iar centromerele formează placa ecuatorială.

La sfârşitul metafazei, la nivelul fiecărui cromozom apare un clivaj longitudinal care interesează atât cromatidele cât şi centromerele.

Procentriolii cresc şi cei doi diplosomi sunt uniţi de cromosomi prin microtubii fusului de diviziune.

Suprafaţa celulară prezintă mişcări de fierbere.

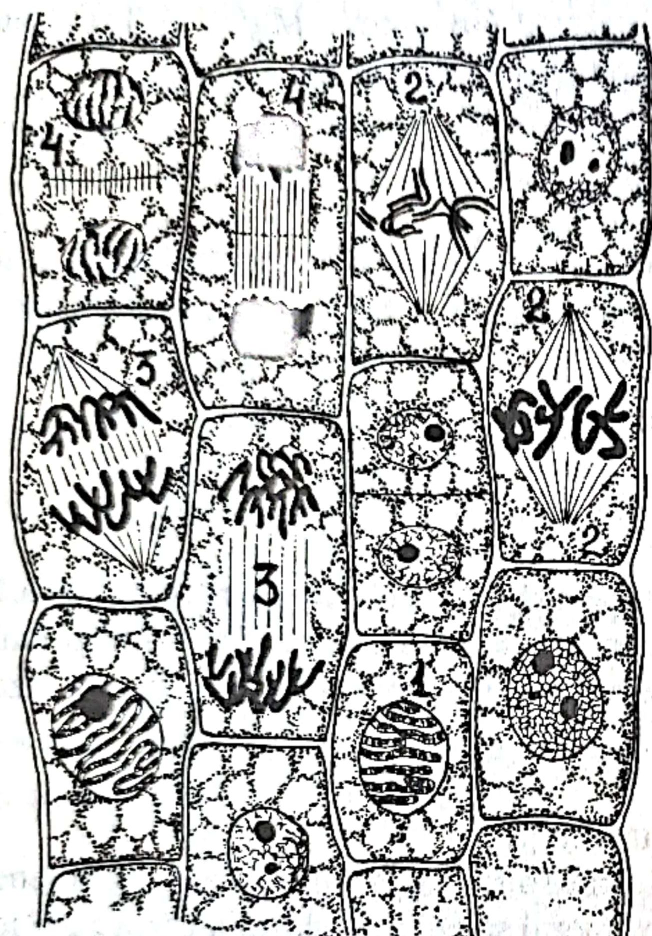


Fig.71. Diferite stadii ale diviziunii cariochinetice în celulele din vârful germinativ al rădăcinii de ceapă: 1-profază; 2-metafază; 3-anafază; 4-telefază.

13.2.1.3. **În anafază** se produce clivarea totală a celor 46 de cromozomi în două grupe identice (92 cromozomi); fiecare din ele migrând către polii opuşi ai celulei.

Spre sfârşitul anafazei cele două loturi de cromozomi ocupă cei doi poli ai celulei iar zona de citoplasmă care-i separă este ocupată de microtubi interzonali.

13.2.1.4. **În telofază** cromozomii se despiralizează; apare învelişul nuclear şi din organizatorii nucleolari se formează nucleolii.

Şanţul de diviziune apărut la sfârşitul anafazei se adânceşte progresiv în plan ecuatorial, perpendicular pe fasciculele de microtubi interzonali.

Organitele se repartizează aproximativ egal în vecinătatea fiecărui nucleu, mişcările periferice diminuă progresiv iar cele două celule fiice se separă complet (citodierează).

Scanned with OKEN Scanner

13.2.2. *Mitoza reducţională*

Mitoza reducţională sau meioza este diviziunea care are loc în cursul gametogenazei şi care asigură reducerea la jumătate a numărului de cromozomi (set haploid de cromozomi = 23). Ea se derulează în gonade (testicul şi ovar) şi constituie unul din fenomenele cele mai importante ale evoluţiei liniei germinale.

Spermatocitele şi ovocitele de ordinul I, celule încă diploide se multiplică prin meioză formând spermatocitele şi ovocitele de ordinul II, celule haploide.

Diviziunea reducţională se derulează tot în patru faze ca şi mitoza somatică: profaza, metafaza, anafaza şi telofaza. Caracteristică este profaza primei mitoze a meiozei care are cinci etape: leptoten, zigoten, pachiten, diploten şi diachineză.

13.2.2.1. **Profaza** este etapa cea mai lungă în care se realizează reducerea numărului de cromozomi.

a. *Stadiul leptoten* începe odată cu creşterea în volum a nucleului, replicarea A.D.N. - ului cromozomial şi diferenţierea cromozomilor care se găsesc în număr diploid.

b. *Stadiul zigoten* se caracterizează prin acolarea longitudinală a cromozomilor omologi (fiecare autozom de origine maternă se acolează la autozomul omolog de origine paternă). O astfel de pereche ia numele de cromozom bivalent sau diadă.

La sfârşitul acestei faze se găsesc 22 cromozomi bivalenţi, deci s-a efectuat reducerea la jumătate a garniturii cromozomiale.

Cromozomii sexuali (xy şi xx) alcătuiesc o formaţiune cunoscută sub numele de veziculă sexuală.

c. *Stadiul pachiten* - La nivelul fiecărei cromatide din diadă apare un clivaj longitudinal care determină apariţia a două cromatide paralele. În urma acestui clivaj, fiecare bivalent va avea patru cromatide alcătuind o tetradă.

În această fază are loc un schimb de material genetic între cromatidele de origine paternă şi cele de origine maternă, schimburi realizate prin legături chiazmatice (crossing over).

d. *Stadiul diploten* se caracterizează prin separarea cromozomilor omologi din fiecare bivalent, ei rămânând legaţi numai la nivelul chiazmelor.

e. *Stadiul de diakinază*. Cromozomii bivalenţi migrează spre periferia nucleului, legăturile lor chiazmatice reducându-se foarte mult. Se individualizează cromozomii sexuali (xy sau xx). Dispare nucleolul iar

Scanned with OKEN Scanner

membrana nucleară se dezintegrază.

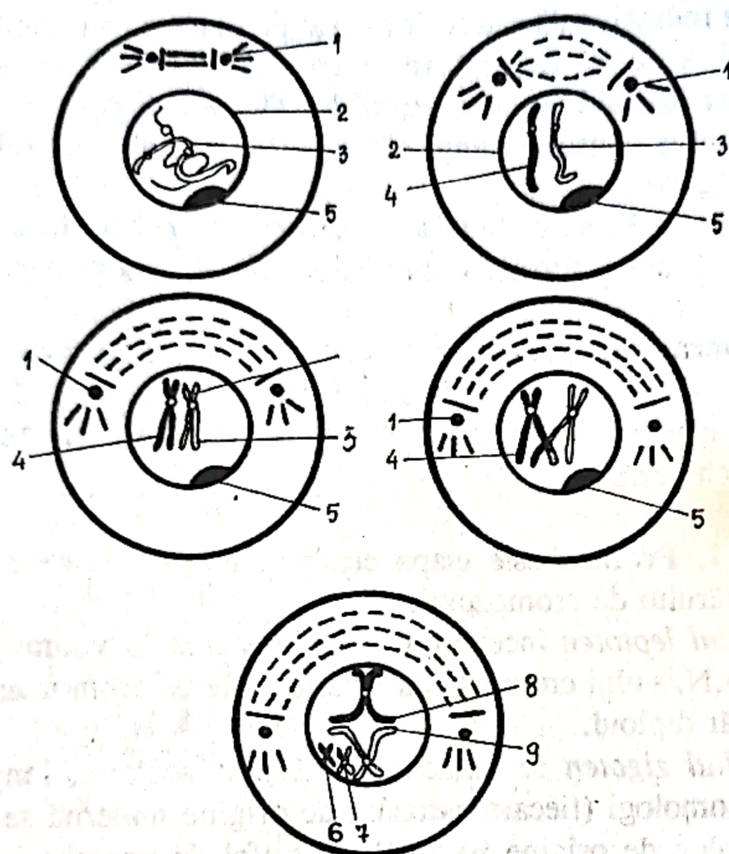


Fig.72. Reprezentarea schematică a profazei meiozei. 1-centrioli; 2-nucleu; 3-autozom matern; 4-autozom patern; 5-vezicula sexuală; 6-gonozom X; 8-material genetic matern; 9-material genetic patern.

13.2.2.2. Metafaza

Cromozomii ocupă planul ecuatorial al celulei iar pe fiecare centromer se inseră microtubii fusului de diviziune.

13.2.2.3. Anafaza

Cromozomii din fiecare bivalent se separă, fenomen denumit disjuncţie şi migrează spre polii celulei.

Scanned with OKEN Scanner

13.2.2.4. Telofaza

Marchează începutul formării celor două celule fiice a spermatocitelor şi ovocitelor II, cu echipamentul cromozomial redus la jumătate (formula haploidă, N = 23 cromozomi).

13.2.3. *Diviziunea de maturaţie*

A doua diviziune a meiozei se desfăşoară conform unei mitoze somatice, realizând o diviziune ecuaţională dar pe celule deja haploide (23 cromozomi), în urma căreia se formează spermatidele şi ovoitidele.

13.3. AMITOZA SAU DIVIZIUNEA DIRECTĂ

Prin diviziunea directă se formează două celule fiice prin simpla strangulare a nucleului şi a citoplasmei celulei mame, fără apariţia cromozomilor, după autoreplicarea materialului genetic.

Se întâlneşte în hepatocite, celule cartilaginoase şi osoase, etc.

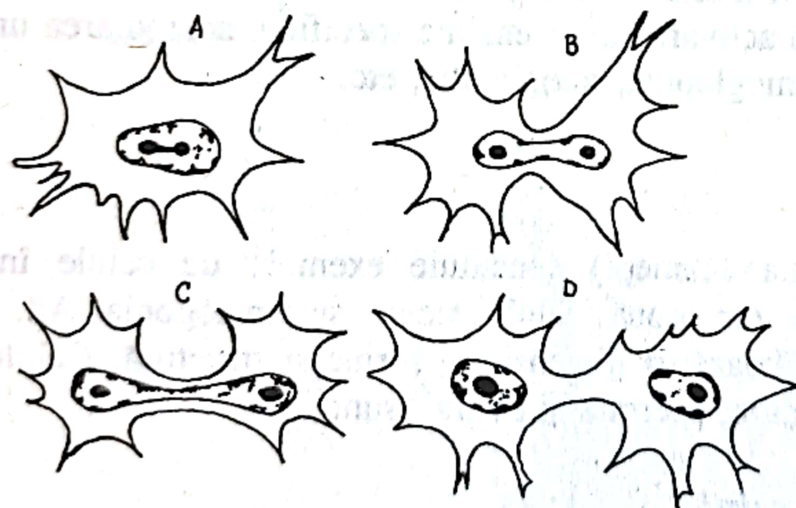


Fig.73. Amitoza.

În unele cazuri (hepatocite) diviziunea nucleului nu este însoţită şi de citodiereză ducând la apariţia celulelor bivalente (în acelaşi mod iau naştere plasmodiile).

Scanned with OKEN Scanner

XIV. DIFERENŢIEREA CELULARĂ

Diferenţierea este proprietatea unor celule ce implică creşterea complexităţii gradului de organizare structurală, ca un corolar al specializării sale funcţionale şi se realizează prin diviziuni de diferenţiere (heterotipică).

Procesul de diferenţiere se desfăşoară pe tot parcursul vieţii individului, începând încă din perioada preembrionară în care se formează gameţii şi terminând cu moartea.

Aprecierea gradului de diferenţiere celulară se estimează prin criterii morfologice, funcţionale şi biochimice.

a. *Criteriile morfologice* oferă relaţii cu privire la forma şi volumul celulelor, la structuralitatea lor internă.

Materialul ideal pentru studiul diferenţierii este şi va rămâne totdeauna embrionul.

b. *Criteriile funcţionale* sunt reprezentate de activităţi funcţionale specifice: motilitatea (spermatozoidul), contractilitatea (fibra musculară), secreţia (celule glandulare), etc.

c. *Criteriile biochimice* evidenţiază: instalarea unei activităţi metabolice specifice prin activarea unor enzime specifice, acumularea unei substanţe specifice ca hemoglobina, mioglobina, etc.

14.1. GAMEŢII

Ovulul şi spermia (gameţii) constituie exemple de celule înalt diferenţiate. Ele derivă din două celule stem: spermatogonia Ad. şi ovogonia, foarte asemănătoare ca dimensiuni, forme şi structură. Celulele adulte apte pentru fecundare, spermia şi ovulul, sunt total deosebite.

14.1.1. *Spermatozoizii*

Spermiile sau spermatozoizii sunt celule flagelate cu o lungime de aproximativ 60 microni.

a. *La microscopul fotonic* apare sub forma unei celule filiforme alcătuită din trei porţiuni:

1. capul, alungit şi aplatizat, măsurând 5 microni lungime şi 2 - 3 microni lăţime; conţine nucleul cu cromatina omogenă şi condensată iar cele 2/3 libere (anterioare) constituie acrosomul.

2. coada, porţiunea cea mai efilată a celulei, conferă mobilitatea

spermatozoidului.

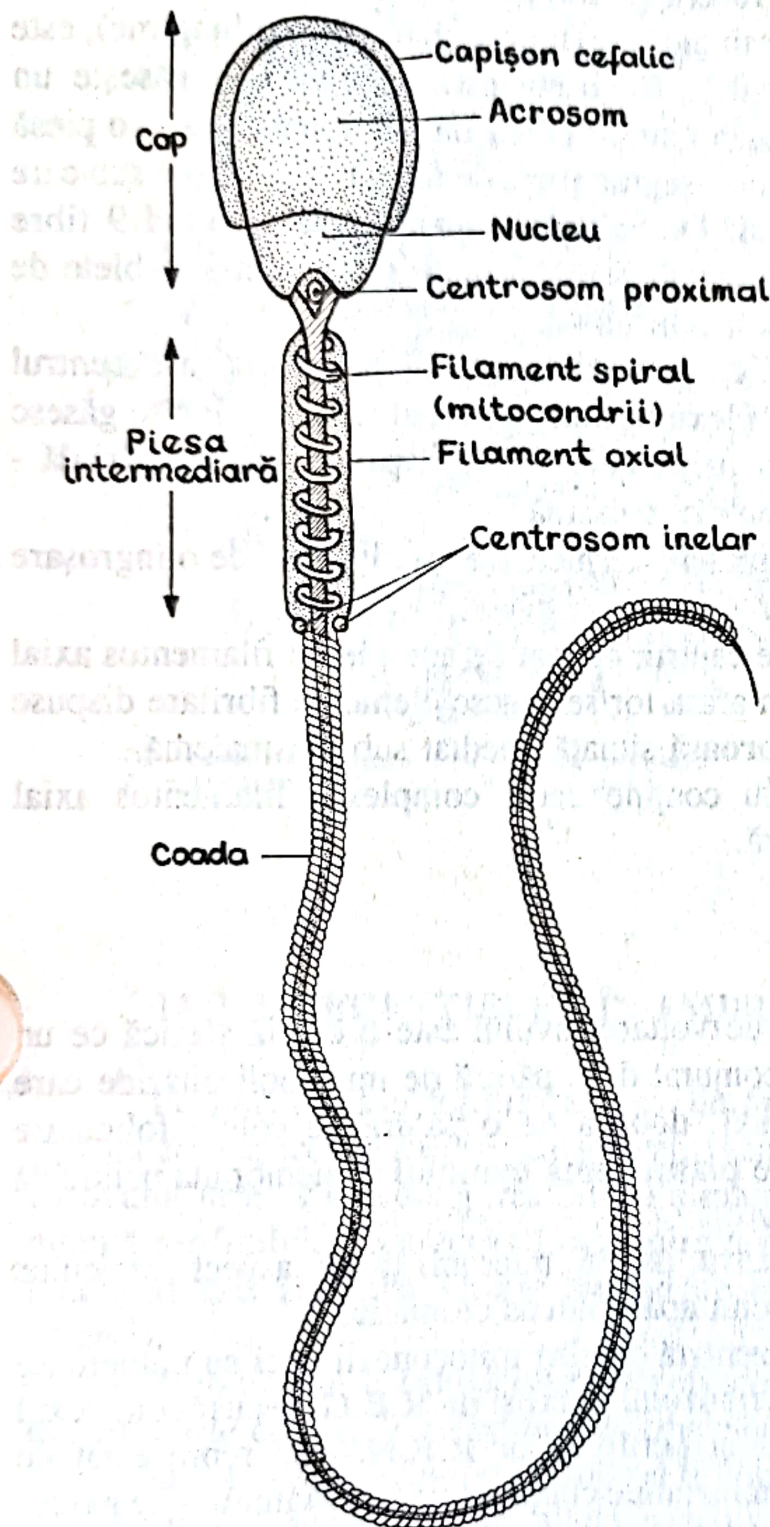


Fig. 74. Structura spermatozoidului uman.

b. *La microscopul electronic* structura spermatozoidului este complexă, el fiind format din:

1. *Capul* spermatozoidului este ocupat în cea mai mare parte de

nucleu; polul anterior al nucleului este învelit de acrosom iar cel posterior prezintă o depresiune numită **fosetă de implantare**.

2. *Gâtul* deşi are dimensiuni foarte reduse (0,4 microni lungime), este o regiune complexă ca structură. In foseta de implantare se găseşte un material dens la fluxul de electroni numit **placă bazală** la care aderă o piesă de joncţiune constituind **coloanele segmentare** de forma unui clopot sub care se găseşte **centriolul proximal**. De coloanele segmentare se prind 9 fibre dense care înconjură un complex **filamentos axial** format din 9 dublete de microtubi periferici şi un dublet central.

3. *Piesa intermediară* cu o lungime de 4 - 5 microni are centrul ocupat de fibrele dense şi complexul filamentos axial. În afara lor se găsesc numeroase mitocondrii cu dispoziţie helicoidală - **spirala mitocondrială** - conţinute într-o pătură subţire de citoplasmă.

Extremitatea distală a piesei intermediare este limitată de o îngroşare a plasmalemei numită anulus.

4. *Piesa principală* are centrul ocupat de complexul filamentos axial înconjurat de fibrele dense; în afara lor se găsesc elemente fibrilare dispuse în spirală formând **pătura fibroasă** situată imediat sub plasmalemă.

5. *Piesa terminală* nu conţine decât complexul filamentos axial acoperit de membrana celulară.

14.1.2. *Ovulul*

Ajuns la completa sa dezvoltare, ovulul este o celulă sferică ce un diametru de 200 microni, înconjurat de o pătură de mucopolizaharide care formează **membrana pellucidă**, dublată de o pătură de celule foliculare numită **coroana radiata**. Între **plasmalema ovulului** şi membrana pellucidă se găseşte primul globul polar.

Nucleul are un diametru de 25 microni şi un aspect veziculos (vezicula germinativă); nucleolul apare intens cromatic.

Citoplasma bine reprezentată conţine mitocondrii mici cu numeroase creste, un număr însemnat de ribozomi liberi şi un R.E.G. redus; complexul Golgi este dispus perinuclear şi periferic iar R.E.N. este reprezentat de vezicule de diferite mărimi. Incluziunile citoplasmatice de vitelius - se găsesc dispersate în toată masa citoplasmatică.

În ovocit activitatea celulară este întreruptă (blocat în metafaza celei de a 2 - a diviziuni de maturaţie), ea reluându-se după pătrunderea unui spermatozoid.

Scanned with OKEN Scanner

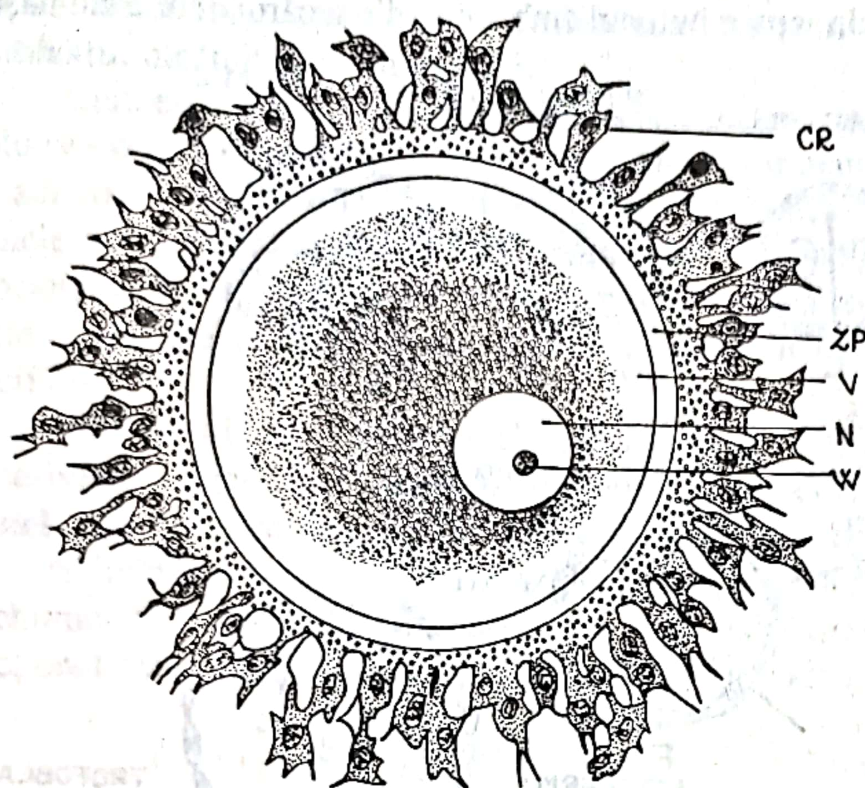


Fig.75. Aspectul ovulului în microscopia fotonică.

CR – coroana radiată
ZP – zona pelucidă
V – stratul periferic al ovoplasmei
N – nucleu
W – nucleol

14.2. DIFERENŢIEREA ÎN EMBRIOGENEZĂ

Fecundarea sau fertilizarea este un fenomen biologic complex care asigură reproducerea speciei; ea se realizează prin unirea spermatozoidului cu ovulul urmată de contopirea intimă a maselor citoplasmatice şi nucleare numită **amfimixie**. Din această contopire rezultă o celulă unică numită **ou fecundat sau zigot** cu un set diploid de cromozomi (23 materni şi 23 paterni).

Zigotul este o **celulă pluripotentă** deoarece din ea vor lua naştere toate tipurile celulare care edifică un organism adult.

După formarea zigotului începe o nouă etapă a diferenţierii numită **segmentare** (o succesiune de mitoze somatice) în urma căreia apare prima structură embrionară numită **morulă**; în acest stadiu încep să apară diferenţe de talie şi poziţie; micromerele ocupă polul animal iar macromerele polul vegetativ, deşi toate celulele morulei au un echipament genetic identic.

În a doua săptămână de dezvoltare diferenţele sunt şi mai evidente:

Scanned with OKEN Scanner

se formează **blastula**, apare butonul embrionar din a cărui celule iau naştere

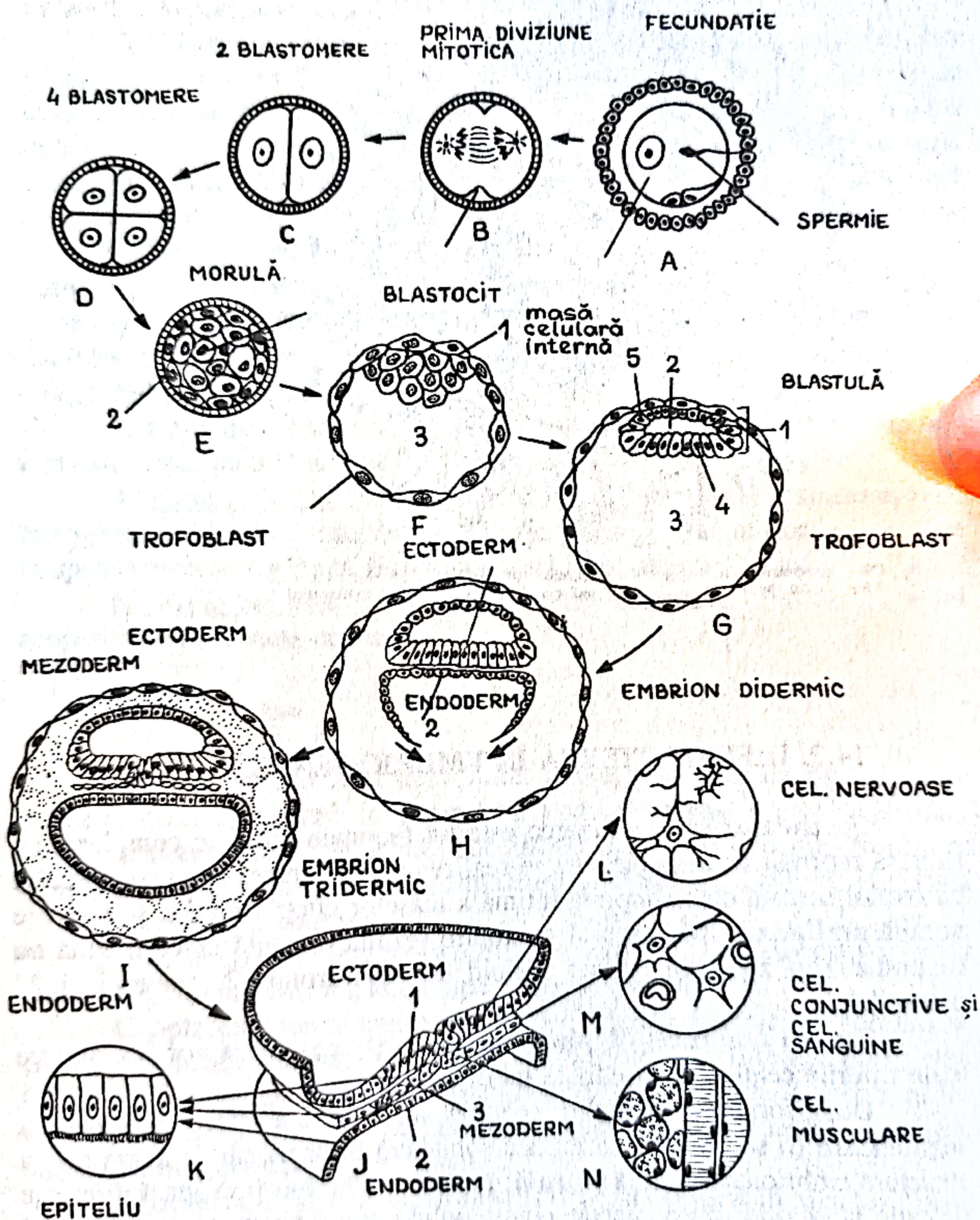


Fig.76. Diferenţierea celulară în embriogeneză.

primele două foiţe embrionare: **endoblastul** alcătuit din celule mici şi **ectoblastul** alcătuit din celule mari.

Celulele acestor două foiţe sunt obligate să urmeze un anumit traseu evolutiv - **celule determinate** - prin represarea unor gene şi activarea altora, sub acţiunea unor **factori inductori**. Pentru ca inductorii să poată acţiona, celulele ţintă ale celor două foiţe embrionare (mezoblastul, a 3 - a foiţă embrionară, se diferenţiază dintr-un anumit teritoriu al ectoblastului) trebuie să fie **permisive** adică să fie permeabile la inductor (receptori membranari specifici).

În dezvoltarea organismelor superioare numărul determinărilor succesive este egal cu numărul inductorilor. Aceste elemente crează în final **celulele stem** sau de origine ale diferitelor tipuri de celule specializate.

Diferenţierea se caracterizează prin apariţia unor modificări pe plan biochimic (sinteza unor proteine specifice: mioglobină, hemoglobină), funcţional (motilitate, contractilitate) şi morfologic (cili, flageli, microvili).

XV. *TEHNICI SPECIALE UTILIZATE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ŞI MOLECULARĂ*

În capitolele anterioare au fost prezentate metodele de obţinere a unor preparate biologice în care ţesuturile îndeplineau condiţiile impuse în vederea unor analize biochimice sau morfostructurale la nivel celular şi subcelular.

Analizele morfostructurale au vizat mai ales tehnicile de microscopie fotonică şi electronică. Este adevărat însă că metodele de investigaţie în biologia celulară şi moleculară nu se reduc doar la ele. Pe de altă parte, obţinerea unor celule care să satisfacă cerinţele impuse de mijloacele de investigare poate urma şi alte căi, cum ar fi: utilizarea unor culturi de celule sau criofracturarea.

De aceea, în acest ultim capitol autorii încearcă o prezentare succintă şi a altor metode folosite curent în biologia celulară şi moleculară, fără a avea însă pretenţia că le-ar fi epuizat.

15.1. CULTURI DE CELULE

Majoritatea tipurilor de celule animale şi vegetale pot supravieţui în condiţii corespunzătoare într-un vas de culturi de celule. Prin cultura de celule se obţine o multiplicare "in vitro" a celulelor provenite dintr-un fragment de ţesut.

Se poate studia comportamentul celulelor în condiţii strict definite; este posibil să determinăm efectele asupra comportamentului celular prin adăugarea sau extragerea de molecule specifice (hormoni sau factori de creştere) şi să obţinem populaţii omogene de celule pentru analize biochimice sau pentru studiul interacţiunilor între un tip celular sau altul.

Observaţiile efectuate se verifică în comparaţie cu comportamentul celulelor "in vivo" (mediul natural). Metoda permite:

1. Studiul caracterelor morfologice şi proprietăţilor biologice ale celulelor din diferite ţesuturi, separate de organism şi sustrase influenţei sistemului nervos şi curentului sanguin;

2. Studiul unor probleme de biologie tisulară (de exemplu afinitatea sau antagonismul între suşe tisulare diferite);

Cultura de celule a început în 1907 cu un experiment destinat rezolvării unei controverse în neurologie, "doctrina neuronală", care susţinea că fiecare fibră nervoasă provine dintr-o singură celulă nervoasă şi nu este produsul fuziunii mai multor celule; doctrina a fost confirmată şi au fost

Scanned with OKEN Scanner

puse bazele culturilor de celule. Experimentele din 1907 au implicat cultura unor fragmente mici de ţesuturi sau explante. Astăzi culturile se fac mai ales din suspensii de celule disociate din ţesuturi existând posibilitatea purificării tipurilor celulare individuale din amestecul de tipuri de celule diferite.

15.1.1. ***Tipuri de culturi de celule.***

I. După felul substratului, culturile de celule pot fi:

- pe suport organic nutritiv;
- pe suport organic nenutritiv;
- pe suport anorganic;
- în suspensie în mediul lichid.

II. După modul de iniţiere a culturii:

A. Culturi iniţiate cu fragmente de ţesut:

a. pe suport nutritiv

- culturi în picătură suspendată
- culturi în flacoane
- culturi în tuburi rotate

b. pe suport nenutritiv

c. în suspensie în mediu lichid (se obţine numai supravieţuirea celulelor)

B. Culturi iniţiate cu celule dispersate:

a. culturi de celule libere în mod natural (culturi de leucocite din sângele periferic, de elemente hematopoietice din măduva osoasă sau de celule recoltate din exudate)

b. culturi de celule obţinute prin dispersarea celulelor din fragmente de ţesut

III. După tipul de material biologic cultivat:

A. Culturi de organe (organocultură) - reprezintă scoaterea din organism a unui fragment de organ (intestin, trahee, rinichi) şi introducerea acestuia într-un mediu nutritiv; acestea se menţin "in vitro" un timp limitat.

B. Culturi de celule - se obţine o multiplicare celulară "in vitro".

a. cultura de ţesuturi obţinută din fragmente de ţesut; în jurul explantului (fragmentului extras) se formează o coroană de celule în multiplicare, de tip fibroblastic sau epitelial;

b. cultura celulară propriu-zisă obţinută prin cultivarea într-un mediu nutritiv a unei suspensii de celule provenită prin dispersarea prin metode fizice sau metode chimice (asocierea factorilor chimici - enzime, agenţi, chelatori - cu factori mecanici - agitaţie).

Scanned with OKEN Scanner

15.1.2. *Materiale de lucru*

Culturile de celule se prepară într-un spaţiu de lucru steril, amenajat special, ce include instalaţia de apă curentă, gaze, electricitate. Nevoile de bază într-un laborator de culturi de celule sunt:

1. Arie de lucru sterilă.
2. Sticlărie, instrumente fine.
3. Dispozitive de curăţat şi sterilizat.
4. Recipiente de stocare pentru mediu, ser, sticlărie şi altele.
5. Incubator şi hotă cu flux laminar.
6. Sursă de apă.
7. Microscop, agitator magnetic, balanţă analitică.
8. Substanţe chimice.

Spaţiul de lucru steril necesită o iluminare adecvată, un trafic scăzut de aer, suprafeţe de lucru uşor de curăţat, o hotă laminară şi lămpi de ultraviolete. Sticlăria trebuie să fie neutră, perfect transparentă, fără neregularităţi; se împarte în recipiente speciale în care se fac culturile şi în sticlărie obişnuită de laborator.

Instrumente fine: bisturie, lame sterile, pense fine, foarfeci chirurgicali. Dispozitivele de curăţat şi sterilizat includ autoclave, un cuptor de sterilizare şi spălătorie de pipete. Recipientele pentru stocare includ un frigider pentru stocarea mediului şi serului, rafturi şi dulapuri pentru sticlărie.

Incubatoarele necesare sunt cu manşon de apă sau cu CO_2, în funcţie de sistemul tampon folosit în mediu. Hota pentru flux laminar trebuie să fie suficient de mare pentru a putea pregăti mijloacele necesare preparării şi hrănirii culturilor, cu o bună iluminare şi un sistem de lumină UV pentru sterilizarea aerului.

Sursa de apă pentru clătire va fi pură, pentru aceasta fiind necesare un deionizor, un aparat din sticlă pentru distilat şi un al doilea pentru bidistilarea apei. Totodată mai este necesar un microscop cu contrast de fază, un agitator magnetic pentru amestecarea soluţiilor şi o balanţă analitică.

Reuşita culturii celulelor "in vitro" depinde în mare măsură de pregătirea sticlăriei, spălarea şi sterilizarea ei, de pregătirea instrumentarului şi în special de tehnicile aseptice aplicate. Mediul de cultură trebuie să asigure celulelor cultivate "in vitro" condiţii apropiate de acelea pe care le oferă organismul viu.

Deosebirile esenţiale dintre aceste două modalităţi de viaţă şi de multiplicare celulară sunt:

Scanned with OKEN Scanner

- "in vivo", celulele sunt supuse controlului neuroendocrin şi influenţei ţesuturilor şi organelor din vecinătate; "in vitro" celulele nu mai suferă acest control;

- "in vivo", aportul de substanţe nutritive şi eliminarea produselor de metabolism se face în mod continuu prin intermediul circulaţiei sanguine şi limfatice; "in vitro", aportul şi eliminarea sunt periodice.

15.1.3. *Tehnicile aseptice*

Tehnicile aseptice presupun următoarele reguli:

- accesul limitat în zona de culturi celulare;
- suprafeţele se decontaminează cu etanol 70% înainte şi după utilizare;
- nu se pipetează cu gura, nu se mănâncă, fumează în zona de lucru;
- hainele de protecţie se folosesc numai în cadrul incintei, fiind interzisă purtarea lor şi în afara ei;
- se spală mâinile înainte şi după operaţii, iar părul se leagă;
- se controlează emisiile de aer, se sterilizează incinta cu lămpi UV.

15.1.4. *Mediile de cultură celulară*

Mediile de cultură celulară trebuie să asigure:

- echilibrul ionic obţinut cu soluţii izotone (păstrarea continuă a presiunii osmotice);
- pH optim, (pH = 7,2 - 7,4) menţinut cu substanţe tampon (tampon fosfat, tampon bicarbonat de sodiu - CO_2); în mediu există şi un indicator de pH (roşu fenol - virează de la galben la roşu aprins şi apoi violaceu);
- temperatură optimă, conţinutul de oxigen şi de CO_2 favorabil;
- elemente nutritive, indispensabile metabolismului: hidraţi de carbon (glucoza), proteine animale, (lichidele biologice cu plasmă, ser sanguin, lichid amniotic) şi aminoacizi esenţiali, grăsimi (colesterol şi cefalină), vitamine (A, B), hormoni, substanţe stimulatoare ale creşterii;
- evitarea contaminării cu germeni patogeni prin adăugarea de antibiotice (penicilină, streptomicină) şi antifungice (micostatin, staminin);
- stimularea multiplicării şi creşterii celulelor prin adăugarea de extracte embrionare;

Mediile de cultură se clasifică după mai multe criterii:

a. după consistenţă: - lichide, semilichide (mediu nutritiv + agar sau coagulant plasmatic sanguin);

b. după compoziţie: - naturale, semisintetice (soluţii sintetice - AA, soluţie salină, vitamine şi componenţi naturali, ser, plasmă, extract embrionar), sintetice;

c. după valoarea nutritivă şi după scopul urmărit: - medii de creştere (permit o proliferare abundentă a celulelor de cultură), medii de menţinere (păstrează activitatea celulelor, fără a le favoriza proliferarea, utilizate pentru întreţinerea culturilor ajunse la dezvoltare maximă).

Mediile nutritive conţin:

1. o soluţie salină (soluţie tampon + indicator);
2. elementele proteice (ser, plasmă, lichid amniotic, aminoacizi);
3. elemente stimulatoare ale creşterii (extracte tisulare de origine embrionară sau adultă);
4. vitamine;
5. antibiotice;

15.1.5. *Tehnica culturii celulare*

Toate etapele culturii celulare respectă riguros regulile de asepsie.

Recoltarea se face din cele mai variate ţesuturi provenite de la om, animal, insecte sau plante. După provenienţa lor, ţesuturile ce urmează a fi cultivate se împart în:

a. ţesuturi normale:
- embrionare (se cultivă uşor, creştere rapidă);
- adulte (medii complexe, creştere lentă precedată de un timp de latenţă de 6-10 zile);

b. ţesuturi tumorale.

Recoltarea trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:
- să evite contaminarea ţesuturilor cu microorganisme prin respectarea riguroasă a asepsiei;
- să se evite traumatizarea în timpul recoltării şi în cursul manevrelor ulterioare;
- sa se realizeze cât mai curând după deces;
- de la recoltare şi până la prepararea culturii, ţesutul se păstrează la rece (la + 4^{0}C), într-o soluţie salină cu antibiotice, timp de 3-4 ore. Dacă culturile nu se pot face în acest timp, ţesutul se spală şi se taie la 1-3 mm, se păstrează la 4^{0}C, în mediu nutritiv, în flacoane ermetice cu dop de cauciuc. Apoi se spală în băi de soluţie salină cu antibiotice şi se urmăreşte înlăturarea cheagurilor de sânge şi a porţiunilor inutilizabile. Tehnica de lucru pentru diferite ţesuturi este următoarea:

A. *Pentru țesuturi embrionare umane* recoltarea se face de la embrioni de 1-3 luni. Se evită excesul de dezinfectante. Embrionul se depozitează într-un cristalizor steril, cu capac, ce conține o soluție salină cu antibiotice. Astfel ambalați, embrionii sunt trimiși în cel mai scurt timp la laborator.

Tegumentul embrionului trebuie considerat contaminat; sterilizarea lui se face cu alcool iodat, având grijă ca antisepticul să nu pătrundă în cavitățile embrionului după incizarea lui. Cu pense sterile, se aleg fragmente de țesut embrionar, îndepărtând cu atenție cheagurile de sânge; fragmentele curate se trec în altă cutie Petri sterilă cu soluție salină. Transvazarea fragmentelor se repetă de 2-3 ori și de fiecare dată se folosesc alte instrumente sterile; prin transvazările succesive se elimină cheagurile de sânge și porțiunile de țesut neutilizabile (strivite).

După ultima spălare, fragmentele se pun într-o epubretă de centrifugă sterilă și cu ajutorul unor foarfeci sterili bine ascuțiți se obține o masă cu aspect omogen. Dacă dispersarea mecanică nu dă rezultate bune, celulele se separă sub acțiunea tripsinei și agitării. Acțiunea tripsinei se oprește prin răcirea soluției și apoi celulele se separă de soluția de tripsină prin centrifugare; celulele se resuspendă în mediul nutritiv și se efectuează numărarea lor cu camera de numărat. În final celulele se introduc în vase de cultură.

Cu o pipetă Pasteur sau cu o ansă sterilă se ia o cantitate din suspensia de țesut embrionar și se întinde pe una din suprafețele unui recipient de cultură, steril, făcându-se o repartizare cât mai uniformă a suspensiei. Recipientul, cu fața pe care este întinsă suspensia situată în jos, se lasă la temperatura camerei sau la termostat la 37^{0}C, timp de 30-60 minute.

După trecerea acestui timp se introduce mediul nutritiv, având grijă ca el să nu antreneze fragmentele de pe sticlă. Recipientele sunt astupate cu dop de cauciuc și incubate într-un termostat la 37^{0}C. În timpul incubării, recipientele nu trenuie mișcate din loc cel puțin 3-4 zile.

Metoda este analogă și la recoltarea de placentă umană, de țesuturi embrionare animale și de țesuturi embrionare de pui (vezi fig. 77).

B. Pentru *țesuturi adulte* provenite prin intervenție chirurgicală (piele, mucoase, mușchi, țesut uterin, rinichi, splină și ganglioni, măduvă osoasă, amigdale, apendice, tiroidă). Fragmentele recoltate se introduc în soluție salină cu antibiotice, unde se lasă 2-3 ore și apoi se efectuează etapele de prelucrare preliminară identice cu ale embrionului.

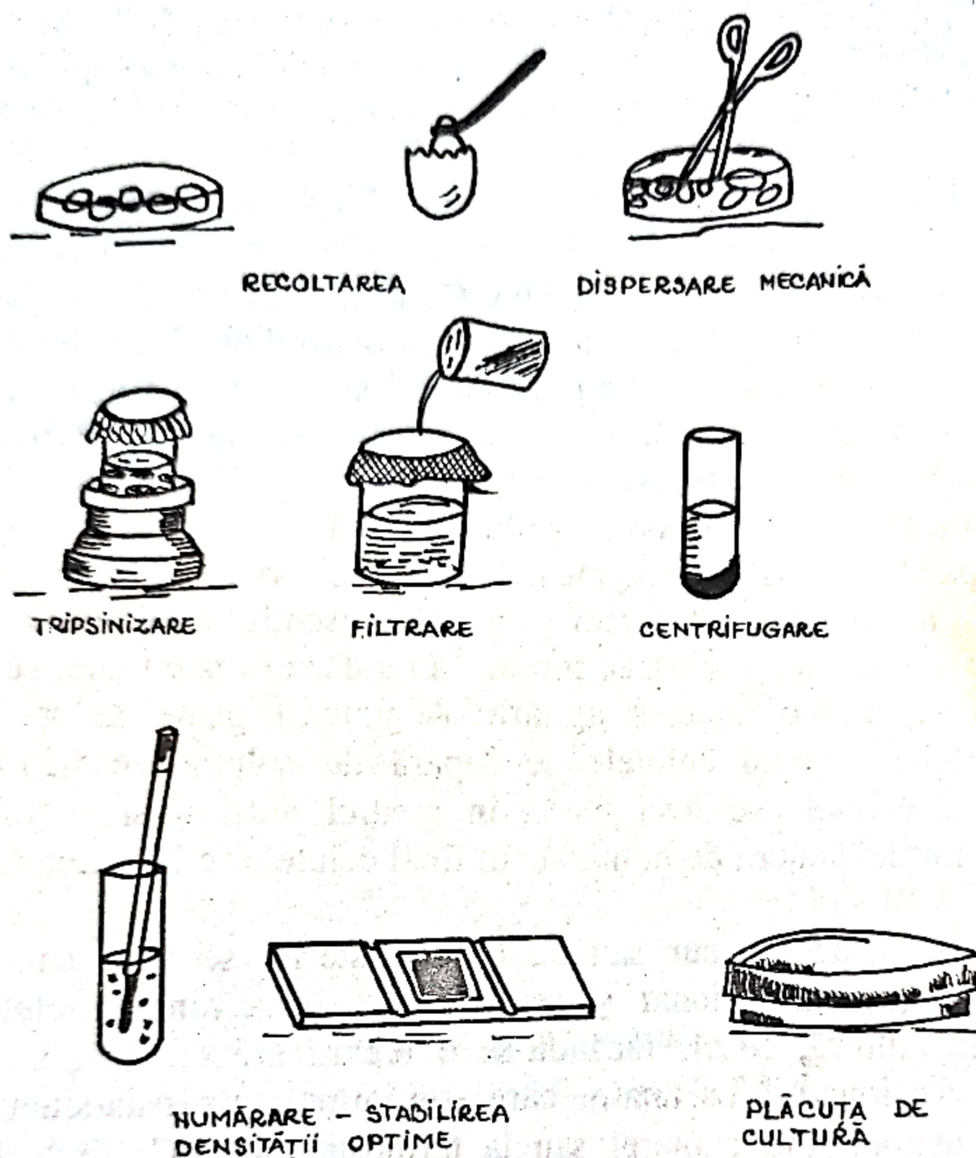


Fig.77. Tehnica culturii de celule pentru ţesuturi embrionare de pui.

C. Pentru *ţesuturi tumorale.*
D. Pentru *ţesuturi vegetale.*

15.1.6. *Controlul culturii*

Controlul culturii trebuie realizat înaintea oricărui experiment. El se poate realiza prin:

1. *Controlul mediilor*:
- control pentru contaminanţi (bacterii, fungii, micoplasme, viruşi);
- control al constantelor fizico-chimice (pH, proteine totale);

- control de eficienţă, aprecierea densităţii celulare pe suprafaţa suportului, evaluarea eficienţei de formare a coloniilor celulare.

2. Controlul morfologic (aspectul morfologic al celulelor în cultură).

a. tehnici de microscopie fotonică:

- examinarea celulelor în stare vie la microscopul cu contrast de fază (aprecierea formei celulelor, a gradului de granularitate a citoplasmei, a conturului nucleului);

- examinarea preparatelor fixate şi colorate;

b. tehnici de histoautoradiografie.

c. tehnici de microscopie electronică.

15.2. CRIOFRACTURAREA

Una din problemele majore în analiza şi vizualizarea preparatelor biologice prin tehnicile de microscopie o constituie prevenirea artefactelor.

Există părerea în lumea ştiinţifică că structurile observate la microscopul electronic nu sunt identice cu starea lor nativă din organismul viu, şi deci starea lor biostructurală ar putea fi modificată. Aceste artefacte ar fi urmarea folosirii metodelor convenţionale de prelucrare bazate pe fixarea chimică şi apoi pe includerea preparatelor biologice.

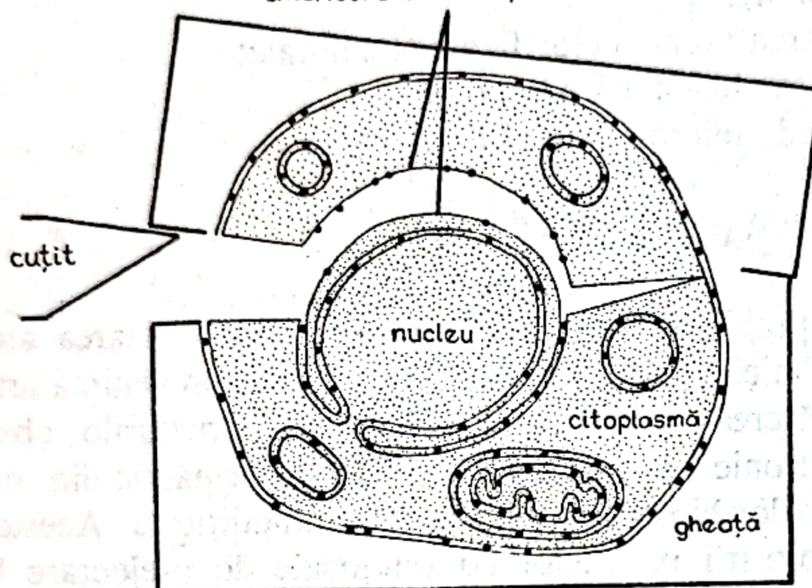
În urma cercetărilor efectuate la începutul deceniului şase de către Hans Moor şi Russell Steere a fost dezvoltată o tehnică ingenioasă numită replicarea prin criofracturare (freeze-fracture replication). Experienţele efectuate la sfârşitul anilor '40 asupra celulelor prin introducerea unor compuşi cum ar fi glicerolul urmate de răciri la temperaturi joase, -150^{0}C, au arătat că celulele ar putea fi îngheţate fără formarea cristalelor de gheaţă.

Procesul de cristalizare intracelulară la viteze mici, atunci când celulele sunt îngheţate în apă, produce moartea celulelor. În cazul unor viteze de îngheţare ridicate de aproximativ 10.000^{0}C/s apa conţinută capătă o structură solid - amorfă, ţesuturile devenind astfel vitroase, păstrând astfel viabilitatea lor. Pe de altă parte, fenomenul de îngheţare rapidă la nivel celular este limitat de conductivitatea termică relativă a apei conţinute, care micşorează deci rata îngheţării rapide a probei. În tehnicile de îngheţare, dezvoltate recent, proba este aşezată pe suprafaţa unei piese metalice, din cupru pur, care a fost răcit la temperatura heliului lichid, 3^{0}K (-270^{0}C).

Conductivitatea termică este suficient de rapidă, în acest caz, pentru a realiza îngheţarea straturilor de celule în intervalul a 2 ms, stopând astfel cele mai rapide activităţi celulare.

Prepararea unui ţesut în vederea examinării prin microscopie

electronică presupune, odată realizată îngheţarea celulelor, secţionarea probei urmată de realizarea unei replici de platină - carbon care va evidenţia, în urma iluminării cu un fascicul de radiaţii X, detaliile morfostructurale analizate.



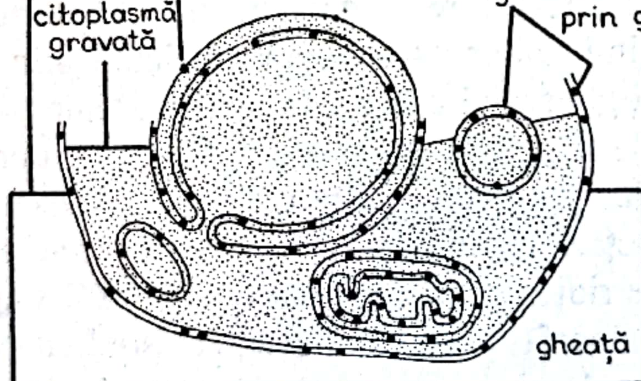


Fig.78. Schema obţinerii unei criofracturi.

Ţesuturile îngheţate instantaneu sunt secţionate cu ajutorul unui crioultramicrotom, un cuţit răcit la temperaturi sub - 190°C, cu azot lichid (vezi fig.78.A), gheaţa din probă fiind apoi îndepărtată printr-un proces de sublimare în vid. Ţesutul fracturat astfel (fig.78.B) este pregătit apoi pentru realizarea replicii de platină carbon (fig.79).

Scanned with OKEN Scanner

În figura 80 se observă că în urma fracturării, suprafaţa probei prezintă neuniformităţi datorate particulelor şi formelor diferite ale

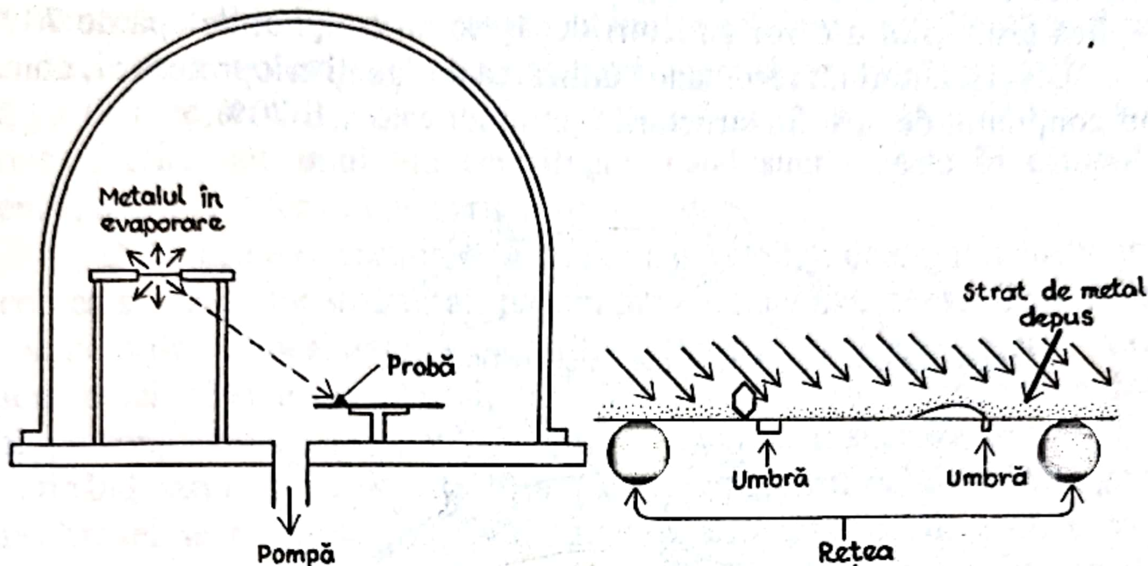


Fig.79. Schema instalaţiei de sublimare şi metalizare a criofracturii.

organitelor prezente în celule, care sunt acoperite apoi în procesul de umbrire şi replicare a probei.

Replicele obţinute permit înţelegerea modului de asamblare a biostructurilor, pe baza imaginilor tridimensionale furnizate în urma explorării electronomicroscopice.

Tehnicilor imaginate de Steere şi Moore li s-au adăugat cele obţinute în urma studiilor făcute de Mosely, Chalcroft şi Bullivant, Collins, Wehrli şi colab. Tonasaki şi Yamamoto. Replica materialului biologic astfel obţinut, în urma criofracturării şi sublimării în vid, are avantajul că evită etapele obişnuite de fixare şi includere păstrând fidelitatea biostructurilor native.

Practic, condiţiile speciale de lucru au condus la realizarea unei aparaturi specializate care se prezintă ca o incintă în care se găsesc: crioultramicrotomul, sistemul de refrigerare cu piesa din cupru pur pe care se aşează materialul biologic, sursele de evaporare a cadmiului şi carbonului, totul fiind vizibil şi mărit în exterior prin intermediul unui microscop.

Evident, un sistem de vidare de 10^{-6} - 10^{-7} torr şi sistemele electronice pentru controlul temperaturilor şi al grosimilor depunerilor vor asigura buna funcţionalitate pe timpul efectuării preparatelor.

Această metodă de criofracturare a materialului are avantajul că permite vizualizarea unor structuri, ca partea internă a membranelor unitare,

Scanned with OKEN Scanner

care în mod normal nu sunt accesibile prin tehnicile de ultramicrotomie clasică. Unele tehnici de crioultramicrotomie utilizează o impregnare a ţesuturilor cu crioproctectori (ex. glicerina 20-30%). Agenţii crioproctectori se aplică ţesuturilor a căror structuri depăşesc un conţinut de apă de 70%.

Diverşi autori nu recomandă utilizarea de agenţi crioprotectori, atunci când conţinutul de apă din structurile ţesutului este sub 70%.

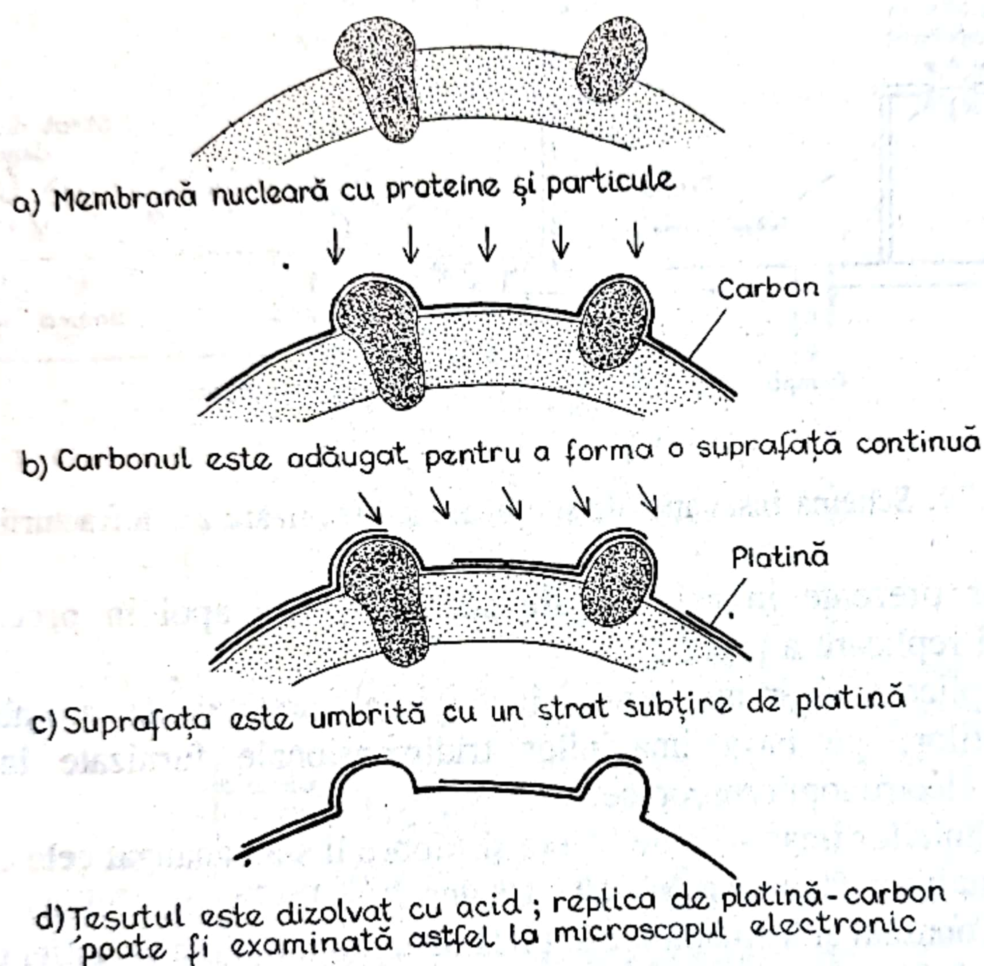


Fig.80. Obţinerea replicii de platină - carbon a probei criofracturate.

15.3. FRACŢIONAREA CELULARĂ

În timp ce se pot determina formele organitelor şi a agregatelor mari macromoleculare din cadrul celulelor şi a ţesuturilor, ba chiar şi poziţia specifică a moleculelor, în urma investigării prin tehnici de microscopie fotonică şi electronică, înţelegerea mai detaliată, din punct de vedere molecular, a celulei, necesită efectuarea de analize biochimice mai profunde.

De multe ori aceste analize au nevoie, pentru o mai clară evidenţiere, de fragmentarea parţială sau totală a celulei, ceea ce a dus la dezvoltarea, în

timp, de către biologi, a unei tehnici de rupere a ţesuturilor şi celulelor, într-un mod controlat. Fracţionarea celulară este tehnica care implică omogenizarea sau destrucţia legăturilor celulelor prin diferite procedee mecanice sau chimice, separarea fracţiunilor celulare fiind făcută în funcţie de densitate şi volum. Tehnica de centrifugare diferenţiată constă în faptul că particulele de diferite mărimi se vor deplasa către partea de jos, dar în zone diferite, ale unui tub centrifugal, când sunt plasate în câmpul de centrifugare la diferite viteze de rotire.

Deoarece este esenţială izolarea unor cantităţi de organite celulare în vederea studiului lor structural, primul pas efectuat în procesul de purificare a structurilor subcelulare îl constituie ruperea peretelui celular sau a membranei plasmatice. Astfel, mai întâi celulele sunt suspendate într-o soluţie conţinând o sare cu un pH apropiat, cum ar fi sucroza izotonică, sau conţinând săruri similare care s-ar găsi în interiorul celulei. "Spargerea" membranei se realizează fie prin agitarea suspensiei celulare cu o viteză foarte mare într-un "malaxor" (centrifugare), fie expunerea sa într-un câmp sonic de înaltă frecvenţă (ultrasonare). În figura 81 prezentăm protocolul desfăşurat în procesul de fracţionare celulară.

Sedimentarea particulelor (a) va continua atât timp cât ele vor fi supuse la centrifugare, şi asta deoarece mediul (suspensia) este mai puţin dens decât particulele. În figura 81.b mediul este compus dintr-un gradient de densitate, de aceea particulele se vor mişca până ce ele vor ajunge într-o zonă a tubului (eprubetei) egală cu propria lor densitate, unde vor forma nişte benzi.

Centrifugarea în "rată zonală" nu produce fracţionări pure în totalitatea lor, ale organitelor celulare. La *centrifugarea în gradient de densitate la echilibru*, organitele sunt separate după densitate, nu şi după mărimea lor. Fracţiunea impură de organit este stratificată în partea superioară a soluţiei care conţine gradientul unei substanţe neionice, ca de exemplu sucroza sau glicerolul. Cea mai densă (concentrată) parte din soluţie este concentrată în partea de jos a tubului centrifugal (unde soluţia tipică de sucroză este de aproximativ 1,25 g/cm^3). Concentraţia descreşte în mod gradual către vârful eprubetei, astfel încât la suprafaţa ei se va găsi cea mai slabă concentraţie.

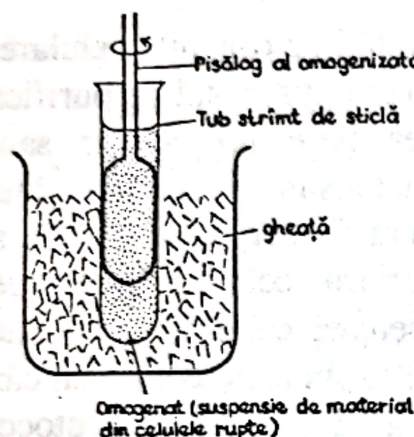
Viteza de centrifugare a eprubetei în care se găseşte conţinutul iniţial se face la viteze mari de aproximativ 40000 r/min, timp de câteva ore, ceea ce va permite fiecărei particule să migreze la o *poziţie de echilibru*. Se ajunge astfel la echilibrul între densităţile lichidului cu ale particulei, nemaifiind posibilă o separare mai mare. Astfel, în preparatele obţinute din

ţesuturile de animale, găsim reticuli endoplasmatici rugoşi având densităţi de 1,2 g/cm^3, şi care sunt bine separaţi faţă de complexul Golgi (densitate de 1,14 g/cm^3) sau de membranele plasmatice (densitate de 1,12 g/cm^3).

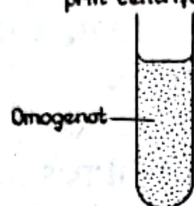
(a)

Pasul 1. Tesut recoltat. Mărunţit cu lama în bucăţi mici. Suspendat în mediu izotonic de omogenizare rece (ex: sucroză 0,25M)

Pasul 2. Omogenizarea fragmentului de ţesut

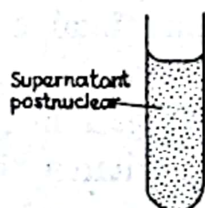


Pasul 3. Izolarea componenţilor subcelulari din homogenat prin centrifugare diferenţială

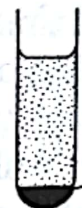


600g / 10 min





12,000g/20min





50,000g/2h

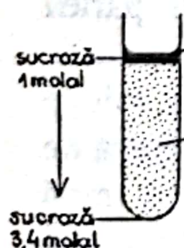




300,000g/3h



(b)



65,000g/2h



Fig.81. Fracţionarea celulară. a. paşii de omogenizare şi fracţionare iniţială prin centrifugare diferenţiată; b. înaltă purificare prin centrifugare în gradient de densitate.

Scanned with OKEN Scanner

În figura 82 ilustrăm o astfel de separare pentru cazul lizosomilor, mitocondriilor şi al peroxisomilor.

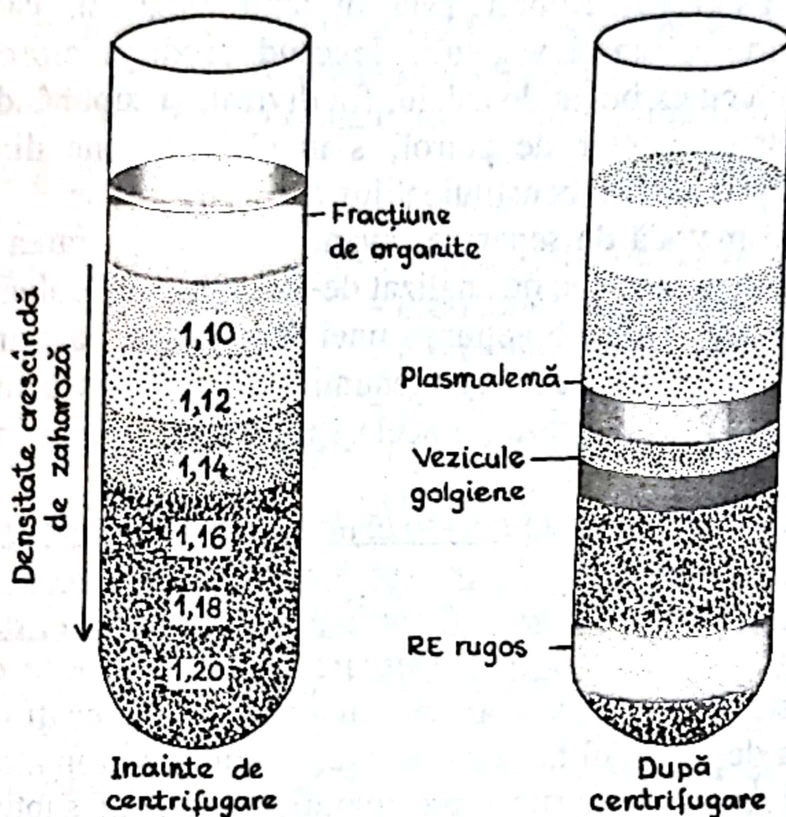


Fig.82. Separarea organitelor celulare prin centrifugare în gradient de densitate, la echilibru (ca material biologic este folosit ficatul de şobolan).

Materialul găsit în faze (v. fig.82 - inelele de sediment formate în eprubetă) este rezultat în urma separării prin centrifugare cu rată de 15000 g. Sub centrifugare, fiecare organit celular (mitocondrie, liposom sau peroxisom) migrează şi apoi rămâne la densitatea de echilibru apropiată lui.

În cazul experimentului de mai sus, ficatul de şobolan se perfuzează cu o soluţie conţinând o mică cantitate de detergent, luată de celule prin endocitoză şi transferată lizosomilor, fără lizarea lor. Astfel, lizosomii devin mai puţin denşi decât ar fi normal ei să fie, ceea ce permite separarea lor netă faţă de mitocondrii. De asemenea această tehnică la echilibru, poate fi utilizată cu succes pentru separarea diferitelor tipuri de nuclee sau nucleoproteine.

Scanned with OKEN Scanner

15.4. CROMATOGRAFIA

Metoda cromatografică a fost introdusă prima oară în analiza chimică de către botanistul rus Mihail Ţvet în anul 1903, în cadrul studiului compoziţiei unor coloranţi vegetali. Trecând produşii clorofilici printr-o coloană umplută cu carbonat de calciu, fin divizat, şi supunând coloana unor percolări repetate cu eter de petrol, s-au obţinut zone distincte, diferit colorate, corespunzătoare constituienţilor acestor produse.

Această metodă de separare, având la bază migrarea diferenţială a componenţilor unui amestec de analizat de-a lungul unei coloane umplută cu fază staţionară adecvată sub acţiunea unei faze mobile, a primit numele de cromatografie (scriere cu culori), denumire ce a rămas consacrată pentru toate tehnicile ce funcţionează pe acelaşi principiu, chiar când ele tratează substanţe incolore.

Deci cromografia este *o metodă de separare de mare performanţă ce reuneşte o serie de metode de analiză bazate pe separarea componentelor unei probe, prin migrarea lor diferenţiată între două faze, dintre care una este staţionară, cealaltă mobilă*. Migrarea diferenţiată este o consecinţă a vitezelor diferite cu care componenţii amestecului antrenaţi de faza mobilă se deplasează de-a lungul fazei staţionare, în coloana cromatografică sau un echivalent al acestuia, hârtie cromatografică sau strat subţire depus pe o placă.

Caracteristicile metodei cromatografice sunt:

- capacitatea de rezoluţie foarte mare, concretizată în posibilitatea separării unor amestecuri speciale de componenţi asemănători;
- sensibilitate remarcabilă;
- universalitatea domeniilor de aplicare;
- simplă, accesibilă, rapidă;

15.4.1. *Clasificare*

1. În funcţie de mecanismul ce stă la baza procesului elementar de separare şi după natura celor două faze, metodele cromatografice se clasifică în felul următor:

a. cromatografie de adsorbţie - cromatografie lichid-solid
- cromatografie gaz-solid

b. cromatografie de repartiţie - cromatografie lichid-lichid
- cromatografie gaz-lichid

c. cromatografie prin schimb ionic

d. cromatografie de excludere-difuzie

2. În funcţie de natura fazei staţionare şi de natura fazei mobile avem:

a. fază staţionară solidă

- fază mobilă solid-lichid - cromatografie de adsorbţie pe coloană
  - cromatografie pe strat subţire
  - cromatografie prin schimb ionic
- fază mobilă gazoasă solid-gaz

b. fază staţionară lichidă

- fază mobilă lichidă lichid-lichid - cromatografie de repartiţie pe coloană
  - cromatografie pe hârtie
  - cromatografie de excludere-difuzie
  - cromatografie pe strat subţire
- fază mobilă gazoasă lichid-gaz - cromatografie de repartiţie pe coloană
  - cromatografie pe coloane capilare

15.4.2. *Separarea proteinelor prin cromatografie*

Una din cele mai utilizate metode de tracţionare a proteinelor implică cromatografia, tehnică ce a fost utilizată iniţial pentru fracţionarea compuşilor cu greutate moleculară mică, precum zaharurile şi aminoacizii.

Cel mai utilizat tip de cromatografie pentru separarea moleculelor mici este cromatografia de partiţie; o picătură de probă este aplicată pe un suport, cum ar fi o bucată de hârtie absorbantă (în cromatografia de hârtie) sau o bucată plastic sau sticlă acoperită cu un strat subţire de material absorbant inert, cum ar fi celuloza sau gelul siliconic (cromatografia în strat subţire). Unui amestec de solvenţi, cum ar fi apa şi alcoolul, îi este permis să pătrundă în bandă dintr-un capăt. Pe măsură ce solvenţii se mişcă de-a lungul benzii, ei antrenează moleculele probei în solvenţii respectivi. Solvenţii sunt selectaţi astfel ca unul din ei să fie absorbit mai puternic pe materialul absorbant decât celălalt. În acest timp, moleculele care sunt mai solubile în solventul absorbit sunt relativ întârziate, în timp ce acelea care sunt mai solubile în celălalt solvent se mişcă mai rapid. Pentru a detecta localizarea diferitelor molecule, cromatograma este uscată şi apoi colorată.

Se folosesc pe scară largă, pentru analiza diferitelor molecule mici, diverse forme cromatografice pe hârtie şi în strat subţire. După ce proba a fost aplicată la bază şi uscată, o soluţie conţinând un amestec de doi solvenţi a fost trecută încet prin hârtie prin acţiune capilară. Diferitele componente

din probă se mişcă la rate diferite în hârtie conform solubilităţii lor relative în solventul absorbit preferenţial de hârtie (vezi fig. 83).

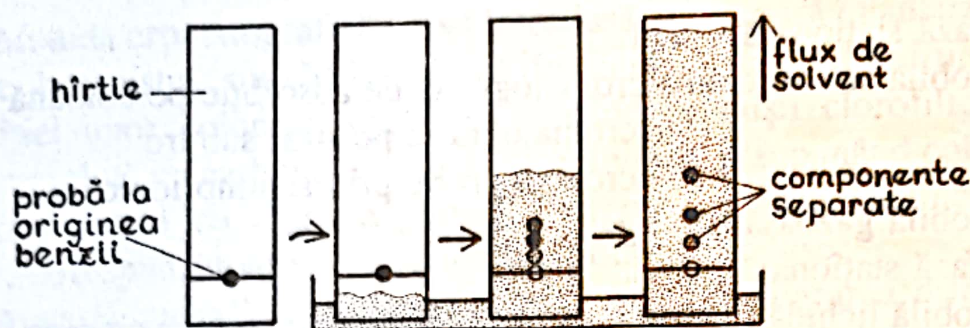


Fig.83. Separarea moleculelor mici prin cromatografie pe hârtie.

Proteinele sunt adeseori fracţionate prin cromatografie pe coloană, în care acestea se trec peste o coloană ce conţine un material poros, solid şi diferitele proteine sunt întârziate la rate diferite prin interacţiunea lor cu matricea. În acest mod, diferitele proteine pot fi colectate separat pe măsură ce scurg pe la baza coloanei. Proba este aplicată la capătul unei coloane cilindrice din sticlă sau plastic, conţinând o matrice solidă permeabilă, imersată în solvent. Prin colană se pompează lent o cantitate mare de solvent ce este colectată în tuburi separate pe măsură ce iese prin baza coloanei. Diferiţi componenţi ai probei traversează prin coloană cu viteze diferite şi sunt astfel fracţionaţi (fig. 84).

S-au dezvoltat multe tipuri de matrici ce permit proteinelor să fie separate fără alterarea structurii lor native. Aceste matrici fac diferenţă între diferitele proteine pe baza sarcinii electrice, mărime sau capacitatea lor de a se lega de grupări chimice particulare pe matrice.

Sunt disponibile multe tipuri de matrici pentru acest scop. Coloanele cu schimbători de ioni conţin suporturi de săruri negative sau pozitive, astfel că proteinele sunt fracţionate în conformitate cu aranjamentele sarcinilor electrice pe suprafaţa lor. În cromatografia pe schimbător de ioni, matricea insolubilă poartă sarcini ionice ce întârzie moleculele de sarcină opusă.

Matricele utilizate de obicei pentru separarea proteinelor sunt dietilaminoetilceluloză (DETAE-celuloză), care sunt încărcate pozitiv şi carboximetilceluloza (Cm-celuloza) şi fosfoceluloza, care sunt încărcate negativ.

Tăria asocierii între moleculele dizolvate şi matricea schimbătoare de ioni depinde de gradul ionic şi de pH-ul soluţiei de eliţie, care poate fi de altfel variat într-un mod sistematic pentru a obţine o separare efectivă

(fig. 85).

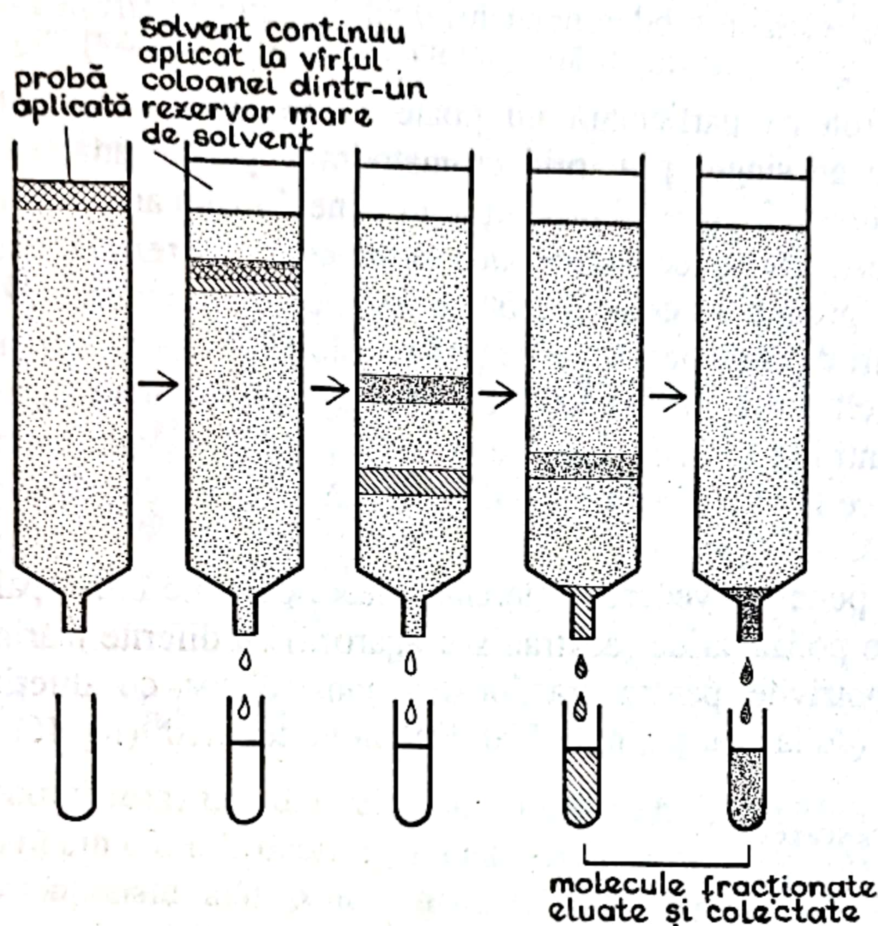


Fig.84. Separarea moleculelor prin cromatografie pe coloană.

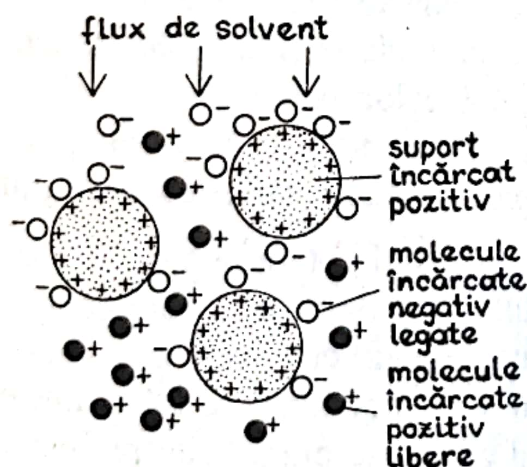


Fig.85. Schema matricii cromatografice în cromatografia pe schimbător de ioni.

Coloanele de filtrare pe gel conțin paturi poroase minuscule și separă proteinele conform mărimii lor; moleculele care sunt destul de mici și trec prin pori, pătrund în interiorul straturilor succesive și călătoresc prin ele, în

timp ce moleculele mari rămân între straturi şi astfel moleculele mici se mişcă mai rapid prin coloană, extrăgându-se primele. Cromatografia de filtrare pe gel este un mod convenabil de a determina mărimea moleculelor de separat.

O proteină particulară nu poate fi, de obicei, separată dintr-un amestec într-un singur pas, prin cromatografie pe coloană, din cauză că fiecare pas creşte în general proporţia proteinei într-un amestec nu mai mult de 20 de ori. Deoarece majoritatea proteinelor reprezintă mai puţin de 1/1000 din proteinele celulare totale, este de obicei necesar să folosim diferite tipuri de coloane succesive pentru a le purifica. În cromatografia de filtrare pe gel, matricea este inertă dar poroasă. Moleculelor care sunt destul de mici pentru a intra în matrice le corespunde un volum mai mare al solventului ce le este disponibil şi din această cauză se deplasează mai încet prin coloană.

Din punct de vedere comercial sunt disponibile într-o paletă variată suporturi de polizaharide (dextran sau agaroză) cu diferite mărimi de pori, suporturi potrivite pentru fracţionarea moleculelor cu diferite greutăţi moleculare (de la mai puţin de 500 până la peste $5x10^6$)(fig.86).

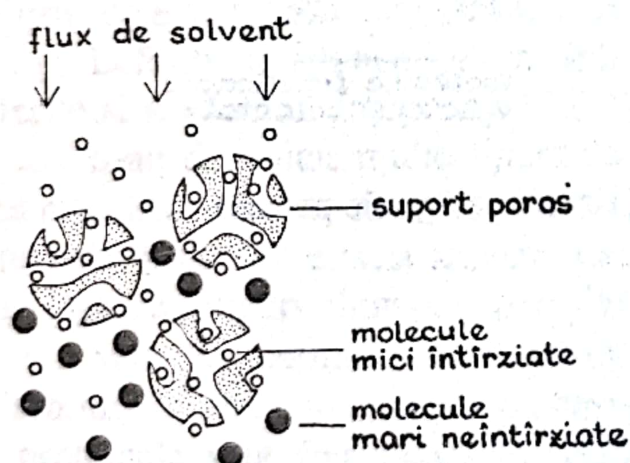


Fig.86. Schema matricii cromatografice în cromatografia de filtrare pe gel.

Un procedeu mult mai eficient, cunoscut drept cromatografie de afinitate, are avantaje cu privire la interacţiunile biologice de legare ce apar la suprafaţa proteinelor. De exemplu, dacă un substrat enzimatic este cuplat covalent de o matrice inertă, de exemplu un suport polizaharidic, enzimele pot fi adeseori reţinute de matrice împreună cu foarte puţine alte proteine.

Într-un mod similar, anticorpi specifici pot fi cuplaţi de o matrice, care poate fi folosită atunci pentru a purifica moleculele recunoscute de anticorpi. Din cauza marii specificităţi a unor asemenea coloane de afinitate, pot fi obţinute purificări de 1000-10000 ori într-un singur pas prin coloană.

Scanned with OKEN Scanner

Cromatografia de afinitate, utilizează o matrice insolubilă, legată covalent de un ligand specific, cum ar fi o moleculă de anticorp sau un substrat enzimatic, ce va lega o proteină specifică. Sunt realizate purificări într-un singur pas printr-o asemenea coloană de afinitate (fig. 87).

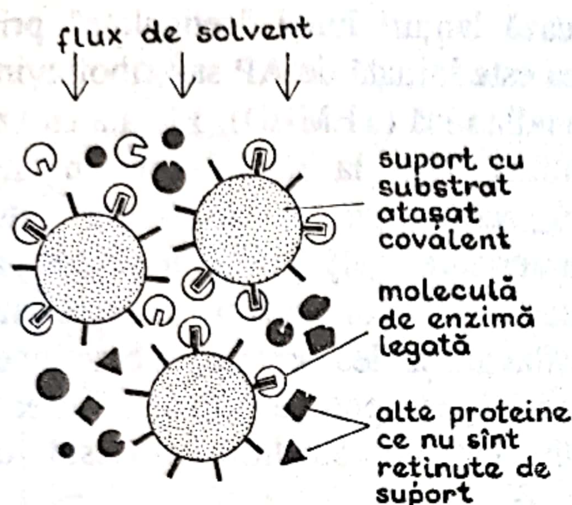


Fig.87. Schema matricii cromatografice în cromatografia de afinitate.

15.5. ELECTROFOREZA

Electroforeza, una din cele mai utilizate tehnici de biologie celulară şi moleculară din ultimile decenii, şi-a adus contribuţii majore la dezvoltarea bazei informaţionale atât pentru nivelele macromoleculare mari, cazul proteinelor şi al acizilor nucleici, cât şi pentru cele de dimensiuni mai reduse, cazul monomerilor cum ar fi aminoacizii şi nucleotidele, blocuri - unităţi de structură ale primelor.

Prin tehnicile de electroforeză se realizează purificarea şi fracţionarea macromoleculară, şi chiar dacă ele se prezintă într-o largă varietate, toate depind de abilitatea moleculelor încărcate cu o sarcină de a migra către un câmp electric. În funcţie de natura sarcinii, pozitivă sau negativă, ele migrează către un catod sau anod. Lungimea deplasării, în timpul migraţiei proteinei, depinde de masa moleculară şi sarcina ei, cât şi de pH-ul mediului, făcând astfel posibilă separarea în condiţii optime a diverselor tipuri de molecule care s-ar putea găsi în amestecul de studiat.

Dintre toate tehnicile de electroforeză folosite, cel mai mult s-au impus acelea care utilizează gelul poliacrilamidic sau din agaroză, medii propice separărilor de proteine şi acizi nucleici, datorită abilităţii moleculelor de a migra în prezenţa unui gradient de câmp electric. Printre avantajele utilizării gelului menţionăm: reproductibilitatea lui, puterea de rezoluţie mare, posibilitatea de control a mărimii porilor pe un domeniu mare de

dimensiuni, inerţia şi stabilitatea chimică la variaţii mari de pH, temperatură şi concentraţie ionică, transparenţă perfectă, rezistenţă mecanică şi flexibilitate.

Gelul de poliacrilamidă (PA) se obţine prin copolimerizarea acrilamidei şi a N,N' - metilenbisacrilamidei.

Monomerii de acrilamidă formează lanţuri lungi "reticulate" prin intermediul bisacrilamidei. Polimerizarea este iniţiată de AP sau riboflavină şi accelerată de N, N, N'N' - tetrametilendiamină (TEMED). El catalizează formarea de radicali liberi din persulfat, care, la rândul lor, iniţiază polimerizarea. Creşterea concentraţiei acceleratorului sau inţiatorului determină creşterea vitezei de polimerizare, O_2 fiind inhibitor al polimerizării, pentru îndepărtarea sa, amestecul de polimerizare se degazează înainte de adăugarea TEMED-ului (riboflavina se descompune sub acţiunea luminii şi eliberează radicali liberi care iniţiază polimerizarea). Prezenţa TEMED-ului este totuşi necesară în anumite condiţii, procesul de polimerizare fiind mai sigur.

În cazul proteinelor, gelurile poliacrilamidice pot fi preparate sub formă de straturi (plăci) netede (vezi fig.88) sau sub forma unor coloane cilindrice (fig.89).

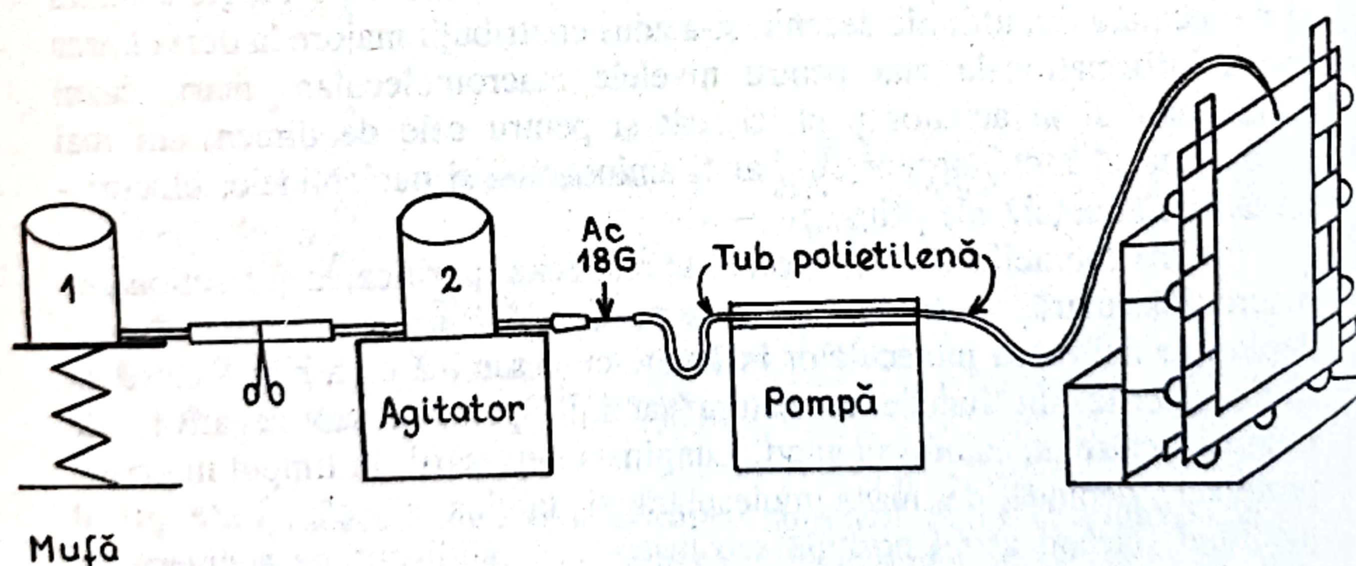


Fig.88. Schema unei instalaţii de electroforeză pe gel poliacrilamidic sub formă de plăci.

În figura 89.a se prezintă schema unui aparat de electroforeză pe gel poliacrilamidic în care se observă prezenţa unor tuburi din sticlă suspendate

Scanned with OKEN Scanner

între rezervoarele tampon, inferioare şi superioare, care conţin gelul prin care vor migra moleculele proteice. Sistemele de tampon pot conţine unul sau mai mulţi agenţi de disociere cum ar fi: detergenţi ionici ca diodecisulfat (SDS), uree.

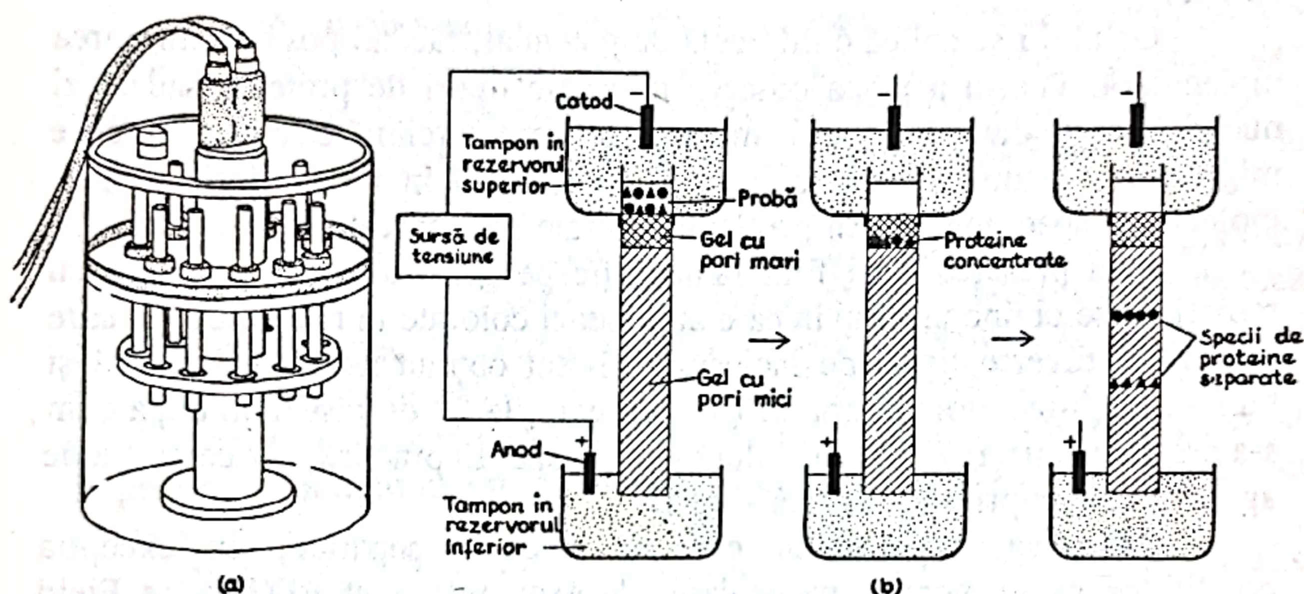


Fig.89. Schema unei instalaţii de electroforeză pe gel poliacrilamidic în coloane.

Figura 89.b prezintă diversele stadii ale moleculelor în procesul de separare: astfel înaintea polarizării, diversele specii de molecule se găsesc într-un amestec, cazul din stânga, odată cu aplicarea câmpului electric toate proteinele trec rapid prin porii gelului, cazul din mijloc, ca mai apoi, în cazul procesului de separare ele să se distanţeze datorită sarcinii electrice şi masei moleculare specifice, cazul din dreapta. În cazul plăcilor se folosesc două tipuri de gel: unul de concentrare, având un pH acid şi porizitate mare şi altul de separare cu pH alcalin şi porozitate mică, care se introduce în plăci ulterior, în partea superioară.

Soluţia poliacrilamidică care se introduce în tubul de sticlă, polimerizează într-un gel semisolid la iluminarea sa cu o sursă în ultraviolet, creând astfel o anumită porozitate gelului. Concentraţia soluţiei, din tuburi sau plăci, determină mărimea porilor în gel, şi anume mărimea efectivă a porilor scade pe măsură ce concentraţia de acrilamidă creşte, şi deci

facilitatea moleculelor de a putea traversa mediul poliacrilamidic.

Polimerizarea în absenţa bisacrilamidei dă naştere unei soluţii vâscoase, iar adăugarea ei permite formarea unei reţele covalente; mărimea "ochiurilor reţelei" sau a porilor va scădea cu creşterea procentului de bisacrilamidă, atingând o valoare minimă când bisacrilamida este mai mare de 5%.

Gelului i se aplică o diferenţă de potenţial, făcând posibilă migrarea moleculară. Pentru a putea observa diferitele tipuri de proteine sau acizi nucleici care datorită masei moleculare sau sarcinii electrice diferite migrează în anumite benzi şi care se localizează în mod diferit pe gel, moleculele specifice sunt în prealabil colorate sau marcate radioactiv.

Prin presarea unui film radiografic pe gelul uscat şi expunere cu radiaţii X se obţine un film în care apar benzi colorate în nuanţe de gri care reprezintă diverse tipuri de molecule. Filmul obţinut astfel mai poartă şi numele de film autoradiografic. Un alt mediu, la fel de răspândit după cum s-a arătat, pentru realizarea gelului este agaroza. În practică, concentraţia de agaroză este cuprinsă între 0,6 - 1,5%.

Mărimea fragmentelor care ar putea fi separate, cu excepţia condiţiilor experimentale particulare (de exemplu cazul PFG-Pulse Field Gel), este cuprinsă între 0,5 şi 20 kb. Gelul este turnat orizontal în aparatele care sunt transparente la radiaţiile UV, astfel încât să fie posibilă, în mod periodic, migraţia.

În cazul utilizării electroforezei pe gel de agaroză la separarea acizilor nucleici, între bazele acizilor nucleici se introduce bromura de etil, moleculă care nu prezintă fluorescenţă în mod spontan, dar care în cazul intercalării între bazele acizilor capătă o fluorescenţă oranj. După migrare, sub iluminare cu radiaţii în UV, ADN-ul este vizualizat în gel, sub formă de benzi. Pentru analiză se poate utiliza un film fotografic sensibil.

Electroforeza în câmp pulsator (PFG) utilizează un gel de agaroză în concentraţii de 1%, permiţând separarea ADN-ului cu mărimi cuprinse între 50kb şi câteva Mb. În acest tip de electroforeză orientarea şi polaritatea vectorului câmp electric sunt schimbate de o manieră programabilă pe tot timpul procesului. Porii de agaroză nu sunt simetrici, molecula de ADN orientându-se în câmp electric cu o viteză în funcţie de masa sa moleculară, la fiecare schimbare a polarităţii câmpului, molecula trebuind să se reorienteze. În acest caz rezultă o întârziere proporţională cu mărimea sa.

Metodele de electroforeză pe gel sunt mult utilizate astăzi în secvenţionarea ADN-ului. Ele sunt folosite în diverse protocoale, dintre care se detaşează cele după metodele Sanger sau Maxam şi Gilbert. Există astăzi

Scanned with OKEN Scanner

încercări de simulare de electroforeză prin tehnici computerizate, care îşi propun să modeleze mişcarea de drift a particulelor sau dimensionarizarea porilor.

15.6. *DIFRACŢIA CU RAZE X*

Odată cu abordarea structurii moleculare, utilizarea razelor X s-a dovedit a fi benefică şi pentru biologia moleculară, imaginea în acest caz fiind una de difracţie a cristalului substanţei de analizat. Difracţia cu raze X oferă rezoluţii mai bune chiar decât cele mai sofisticate tehnici de microscopie electronică.

Utilizând radiaţii X cu lungimea de undă de aproximativ 1Å (0,1 nm) pentru a genera imaginea difractată a unui cristal este posibil să se deducă poziţiile individuale ale atomilor unei molecule, ca unitate de structură cristalină. Imaginea obţinută prin difracţie cu raze X poate impresiona uşor emulsia unui film, făcând posibilă stocarea informaţiei. Razele X au o putere de penetrare cu mult mai mare decât electronii, permiţând astfel analiza unei probe stratificate.

Mai mult, informaţia obţinută nu mai este distorsionată ca în alte tehnici unde este necesară prelucrarea materialului biologic. Imaginea de difracţie produsă de către cristal este determinată de natura structurii lui, a poziţiilor pe care le ocupă atunci în planurile regulate ale reţelei. Astfel, se ştie că dacă un fascicul de raze X, cu lungimi de undă distribuite uniform, cade pe un cristal (de exemplu clorură de sodiu) apar fascicule ce corespund interferenţei produse de către centrii difractanţi din care este format cristalul, după direcţii bine definite.

Dacă aceste fascicule ar întâlni în drumul lor o placă fotografică, ele ar forma nişte pete mai luminoase (petele Laue - după numele fizicianului Max von Laue, care a avut ideea de a folosi un cristal drept reţea de difracţie pentru razele X), din a căror poziţie şi intensitate s-ar putea determina poziţiile atomilor în cristal în acelaşi mod în care am putea deduce structura unei reţele optice - profilul fantelor - printr-un studiu al poziţiilor şi intensităţilor liniilor din figura de interferenţă (vezi fig. 90).

Structura unui cristal se prezintă la scara microscopică ca o reţea cu simetrie cubică (unul din cele mai răspândite aranjamente ale atomilor în solide), având ca cel mai mic element al arhitecturii cristalului laticea (celula unitate), în vârfurile căreia se găsesc plasaţi atomii corespunzători ai moleculei.

Latura unei astfel de latici în cazul cristalului NaCl este de

5,62737Å. Configurația arhitecturală depinde de natura legăturilor între atomi. Laticea este unitatea periodică fundamentală de difracție. Razele X sunt difractate mai ales de electroni, difracția pe nuclee fiind în cele mai multe cazuri neglijabilă. Din studiul *direcțiilor* fasciculelor de raze X difractate se poate găsi simetria de bază a unui cristal, iar din studiul *intensităților* se poate afla modul de distribuție al electronilor în celula unitate.

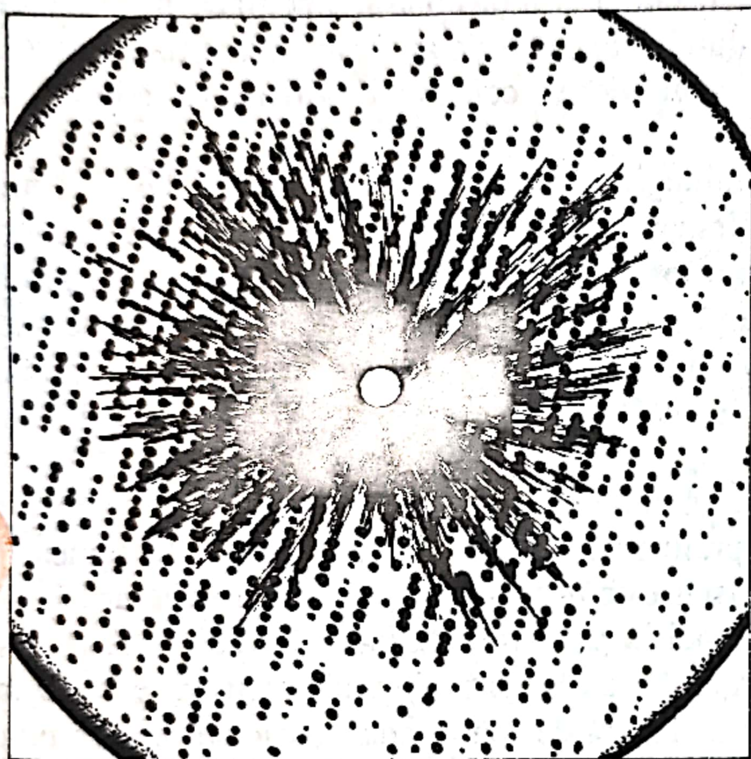


Fig.90. Imaginea de difracție X a unui cristal de mioglobină.

Dacă în microscopia electronică lentilele obiectiv colectează razele difractate și le recombină spre a forma imaginea probei, în cristalografia X recombinarea făcută de cristalograf trebuie să fie bazată pe informația din: poziția spoturilor (reflexia), intensitatea lor de pe plăcile fotografice și fazele undelor, care sunt obținute pe baza comparării imaginilor produse în și fără metalele grele atașate proteinei.

S-a putut observa că atomii cu număr de ordine mai mare din tabelul Mendeleev, deci mai grei, cum ar fi C, N, O și P sunt mai repede detectați decât atomii de H. Din aceleași motive, oricare atom de metal, cum ar fi atomul de fier din molecula de hemoglobină, crează o lumină intensă a razelor X împrăștiate.

Datorită numărului imens de date culese printr-o imagine cristalografică, prelucrarea lor poate dura foarte mult timp, cum de altfel se

şi întâmpla acum doar câteva decenii în urmă, ceea ce a dus la slaba lor utilizare. La ora actuală aceste date sunt analizate şi prelucrate de computere cu programe soft ultraspecializate pentru prelucrarea tridimensională a informaţiilor.

Existenţa acestei posibilităţi, a dus astăzi la utilizarea pe scară tot mai mare a analizei cristalografice cu raze X. Practic, ea permite vizualizarea tridimensională a macromoleculelor proteinelor şi acizilor nucleici, făcând astfel posibilă analiza detaliată a tuturor elementelor spaţiale existente la nivel subcelular.

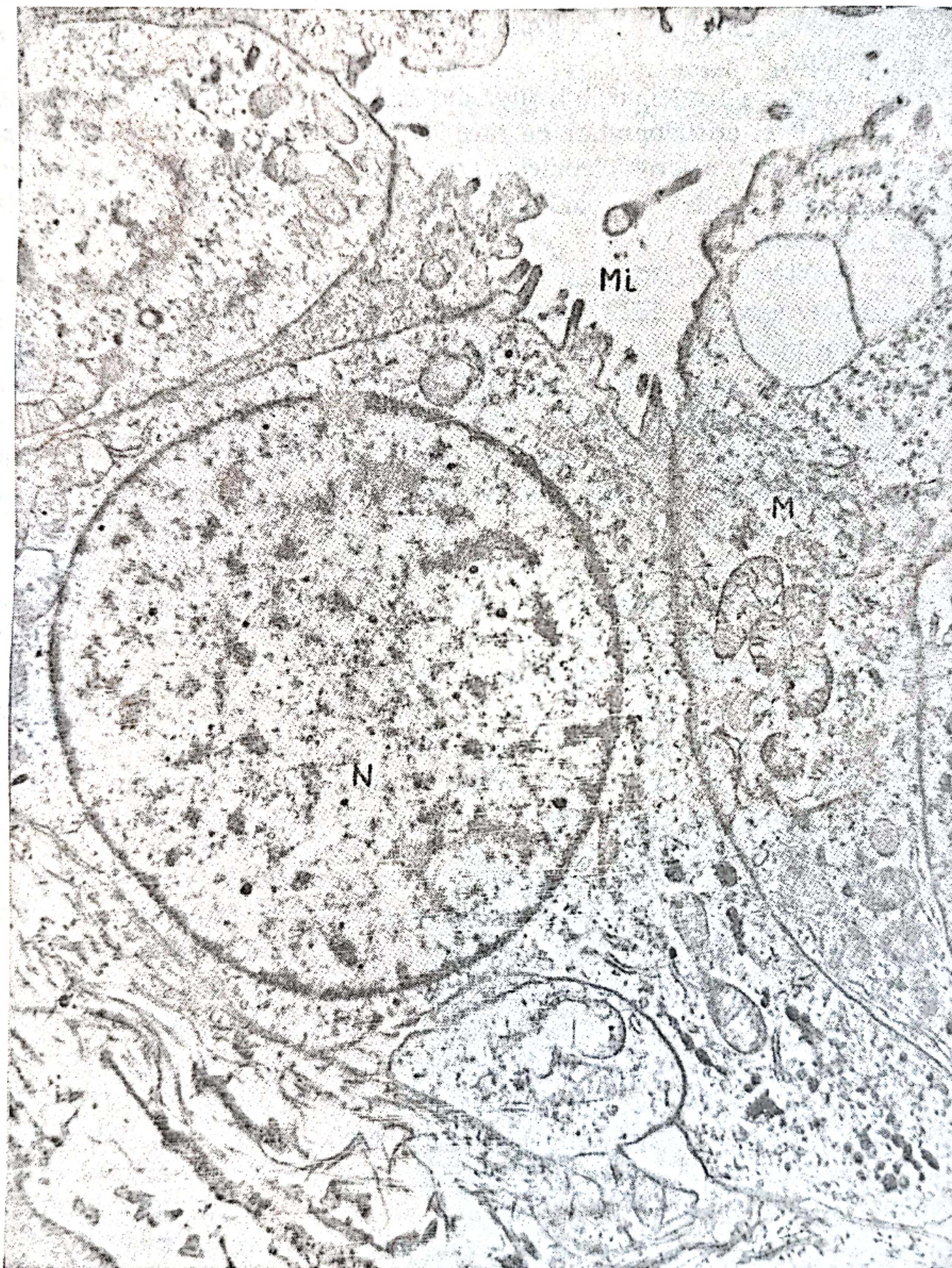
Problema utilizării, la o scară mai largă rezidă în însăşi complexitatea instalaţiilor necesare. Fără aportul calculului matematico-electronic nu se poate pune problema obţinerii unor rezultate rapide în interpretarea datelor, tocmai datorită complexităţii metodei de transformare a informaţiilor într-o imagine tridimensională. În ciuda acestor dificultăţi, difracţia razelor X tinde să devină o tehnică tot mai utilizată datorită faptului că este singura cale cunoscută astăzi pentru a determina în totalitate aranjamentul atomilor în cele mai multe molecule.

De exemplu, structura proteinei poate fi calculată la o rezoluţie de 3-4Å dezvăluind principala serie a lanţului polipeptidic. Având un cristal de înaltă puritate s-a ajuns la revelarea cu o rezoluţie 1,5Å punând în evidenţă poziţia tuturor atomilor nehidrogeni din proteină.

Nu în ultimul rând ar trebui menţionat aportul adus de cristalografia cu raze X în studiile de ADN, cum a fost în cazul modelului lui Crick şi Watson în 1953, când cei doi au propus modelul, atât de cunoscut astăzi, al structurii ADN, pe baza interpretării datelor provenite în special din cristalografia cu raze X.

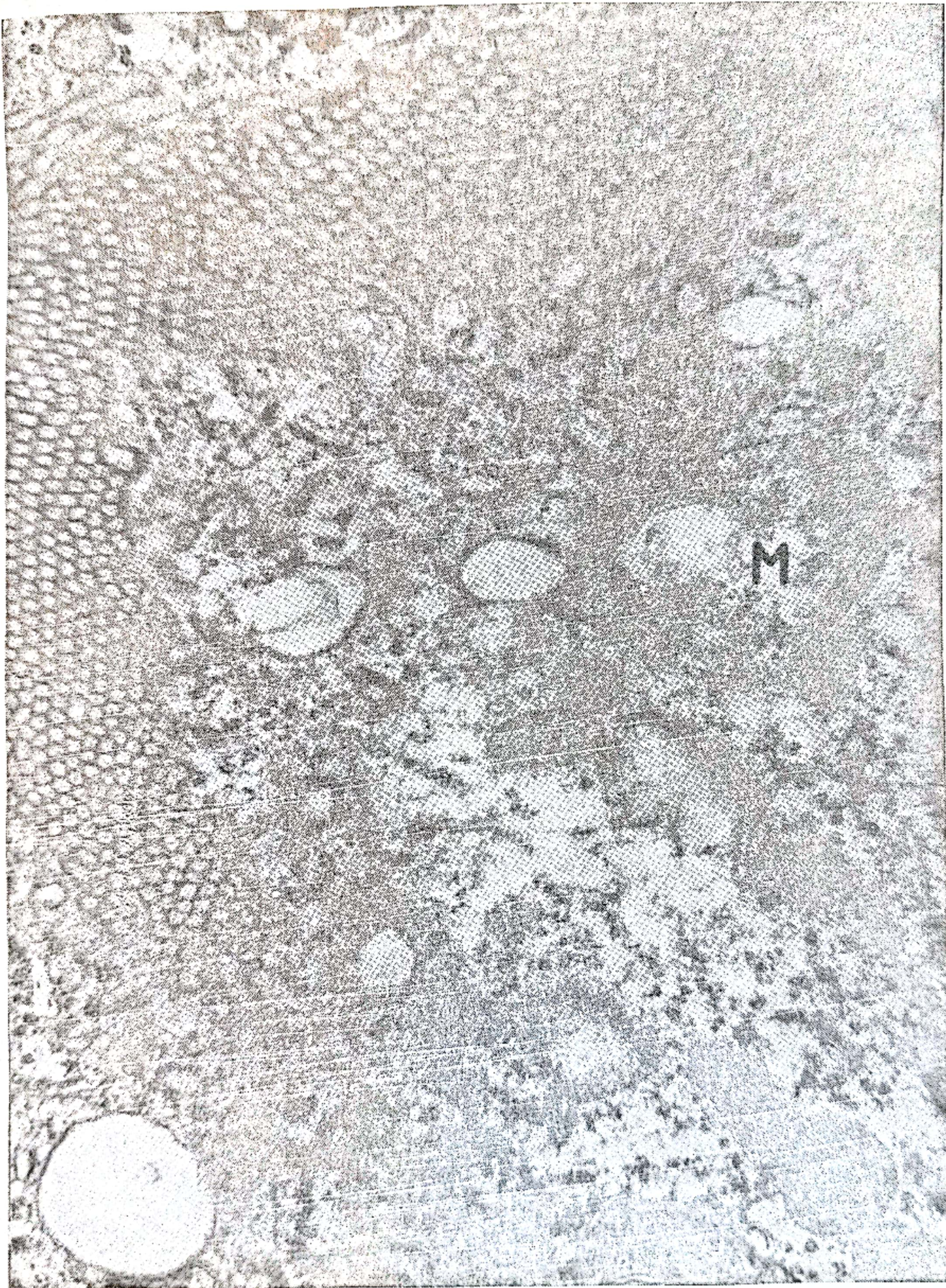
Scanned with OKEN Scanner

XVI. *ELECTRONOMICROGRAFII*



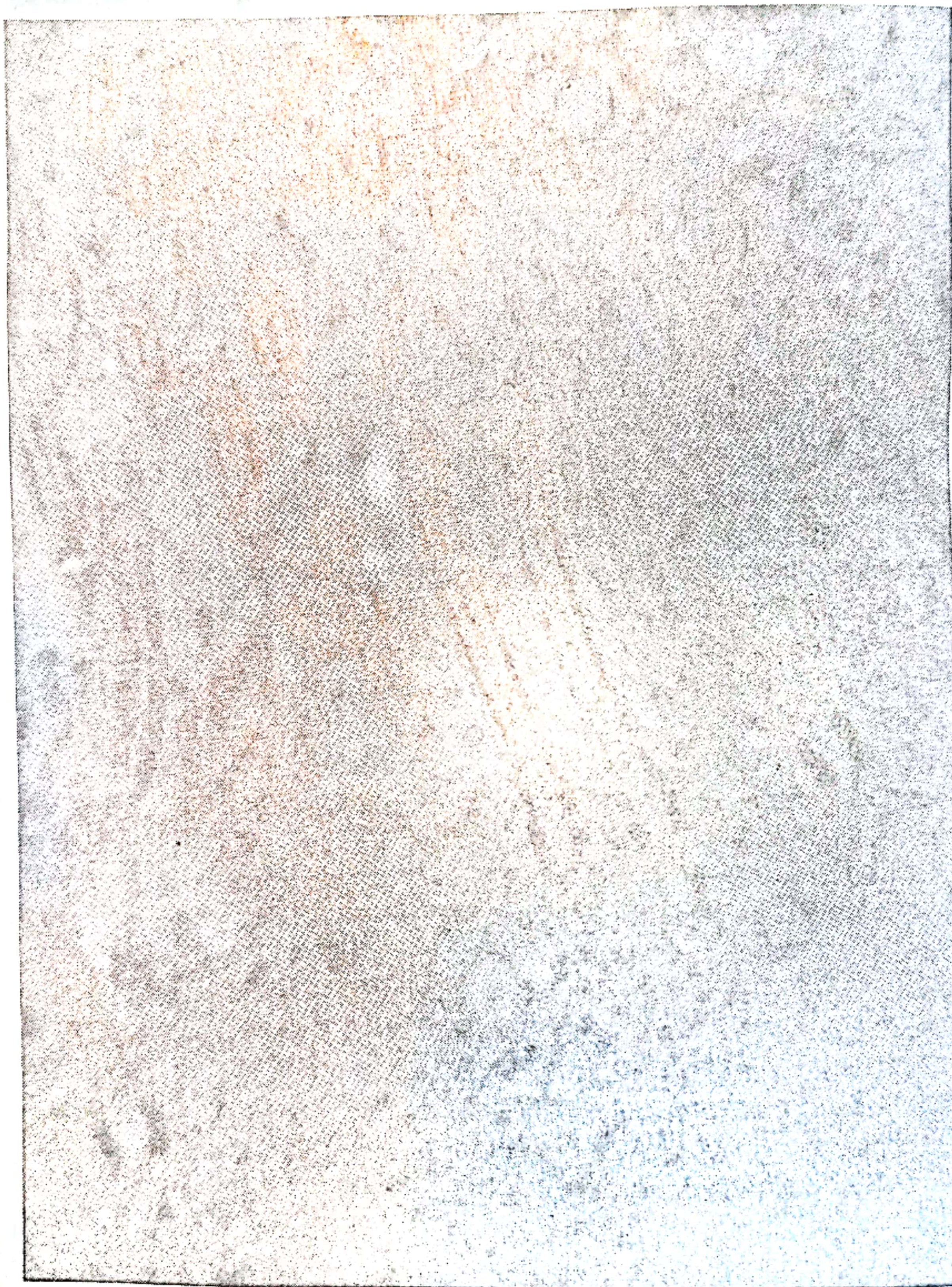
Planşa 1 Nefrocit embrionar uman - Microvili secţionaţi longitudinal (Mi), nucleu (N), mitocondrii (M) - 16.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



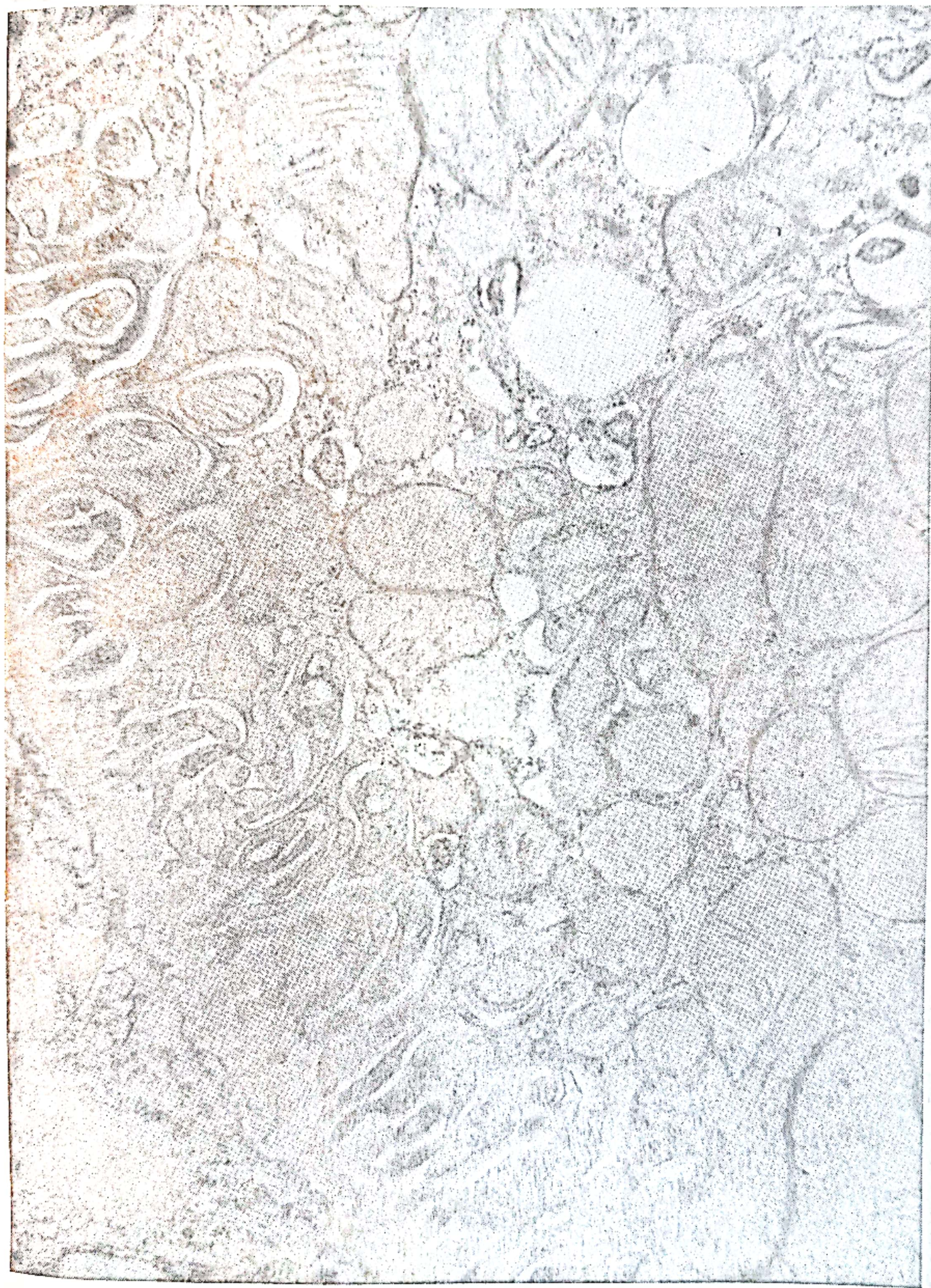
Planşa 2 Nefrocit tub contort proximal fetus uman - Microvili secţionaţi transversal (Mi), mitocondrii (M) --51.200 X (colecţia Prof. Dr. C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



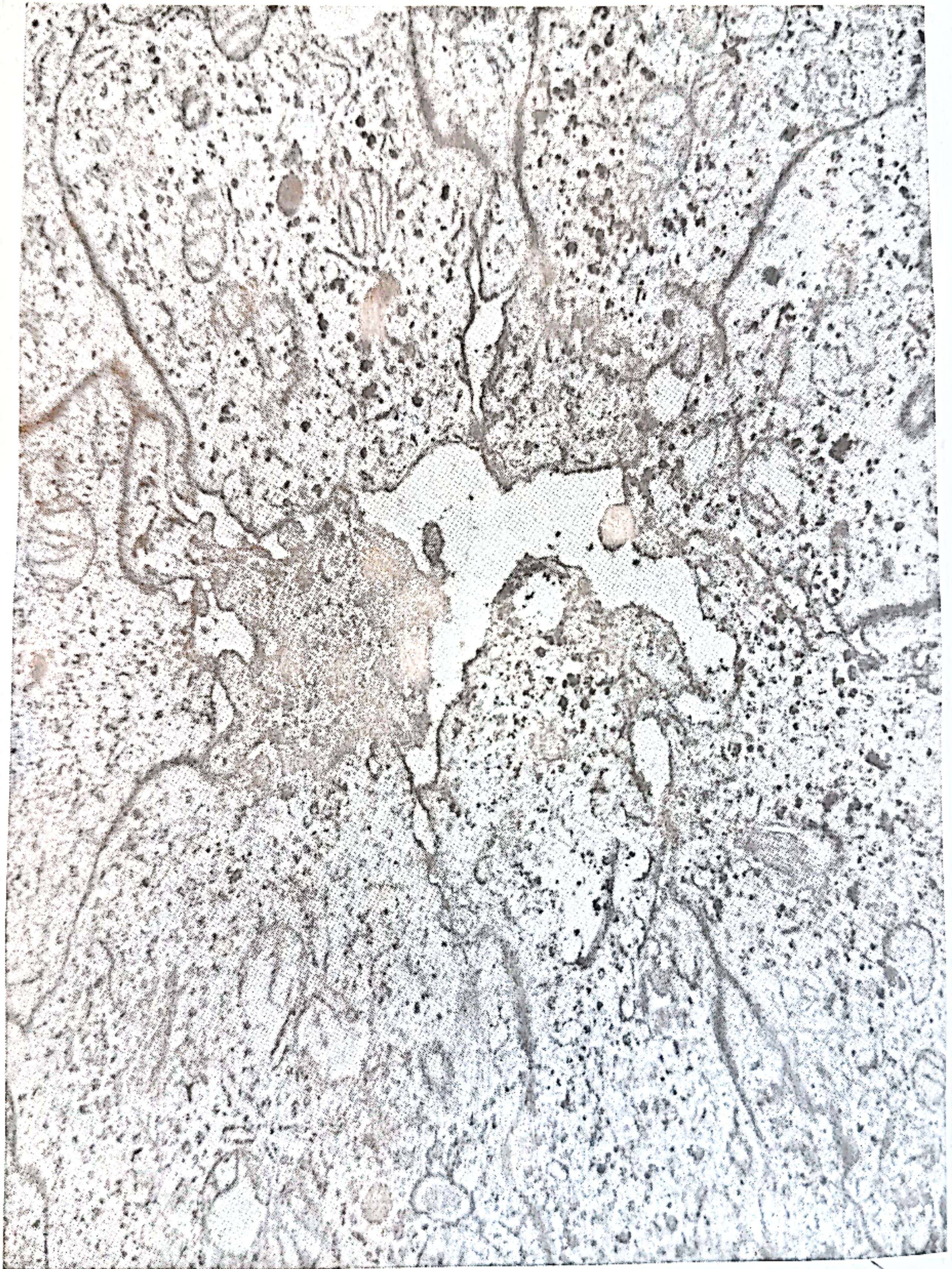
Planşa 3 Mucoasa nazală umană - Cili vibratili secţionaţi longitudinal - tija cilului (T), corpusculul bazal (CB) - 58.000 X (colecţia Prof.Dr.Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



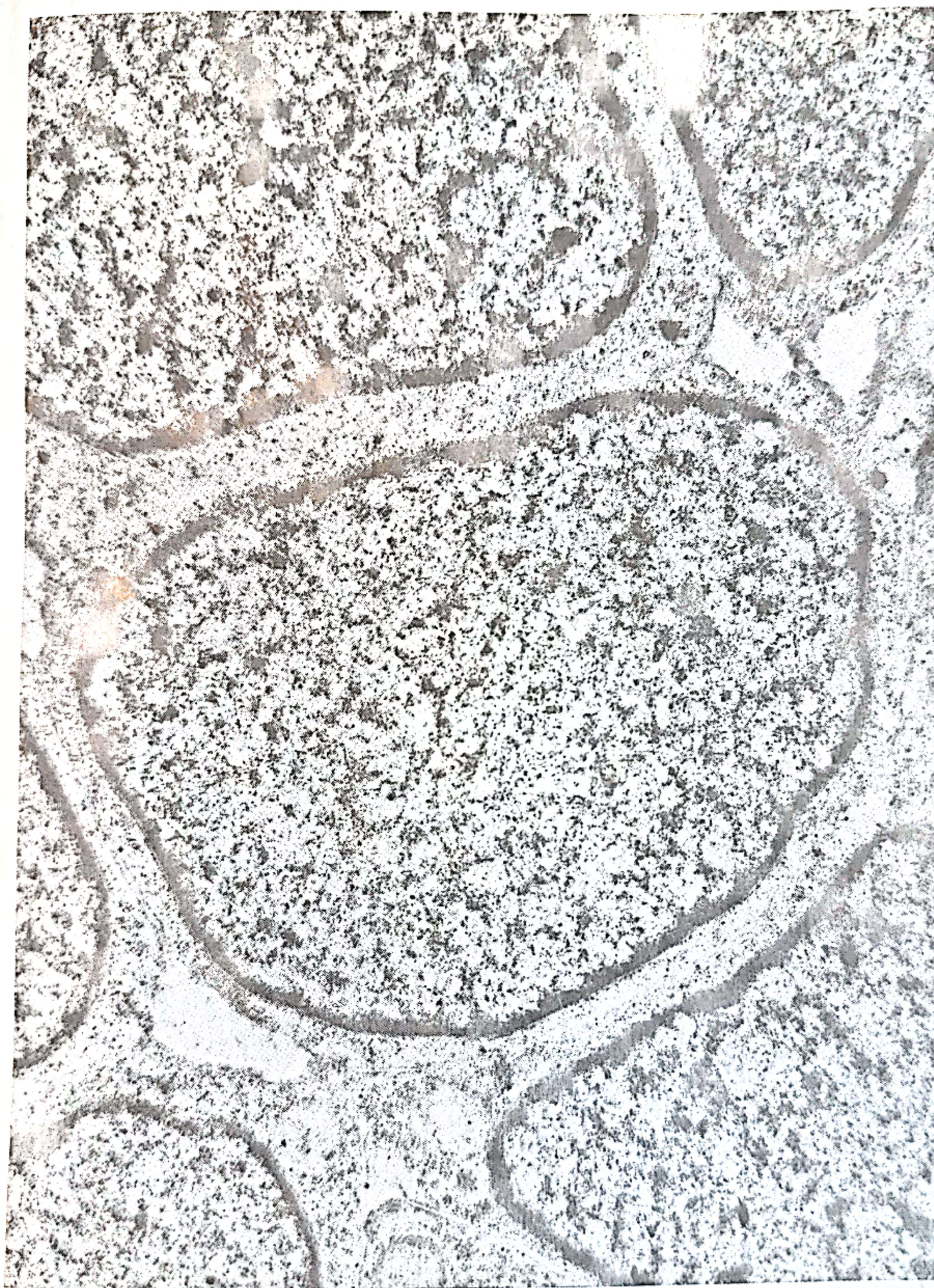
Planşa 4 Nefrocit tub contort distal fetus uman - Labirint bazal (LB), membrana bazală (MB) mitocondrii (M) - 48.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



Planşa 5 Nefrocite embrion uman - Joncţiuni impermiabile (JI), mitocondrii (M), lizosomi secundari (LS) - 39.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



Planşa 6 Celule blastem metanefrogen uman - membrana cromatică (Mc), por nuclear (P), euromatina (E) - 26.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



Planşa 7 Nefrocit fetal uman - Nucleu (N), nucleoli (Nu), mitocondrii (M), lizosomi (L) - 16.00 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner

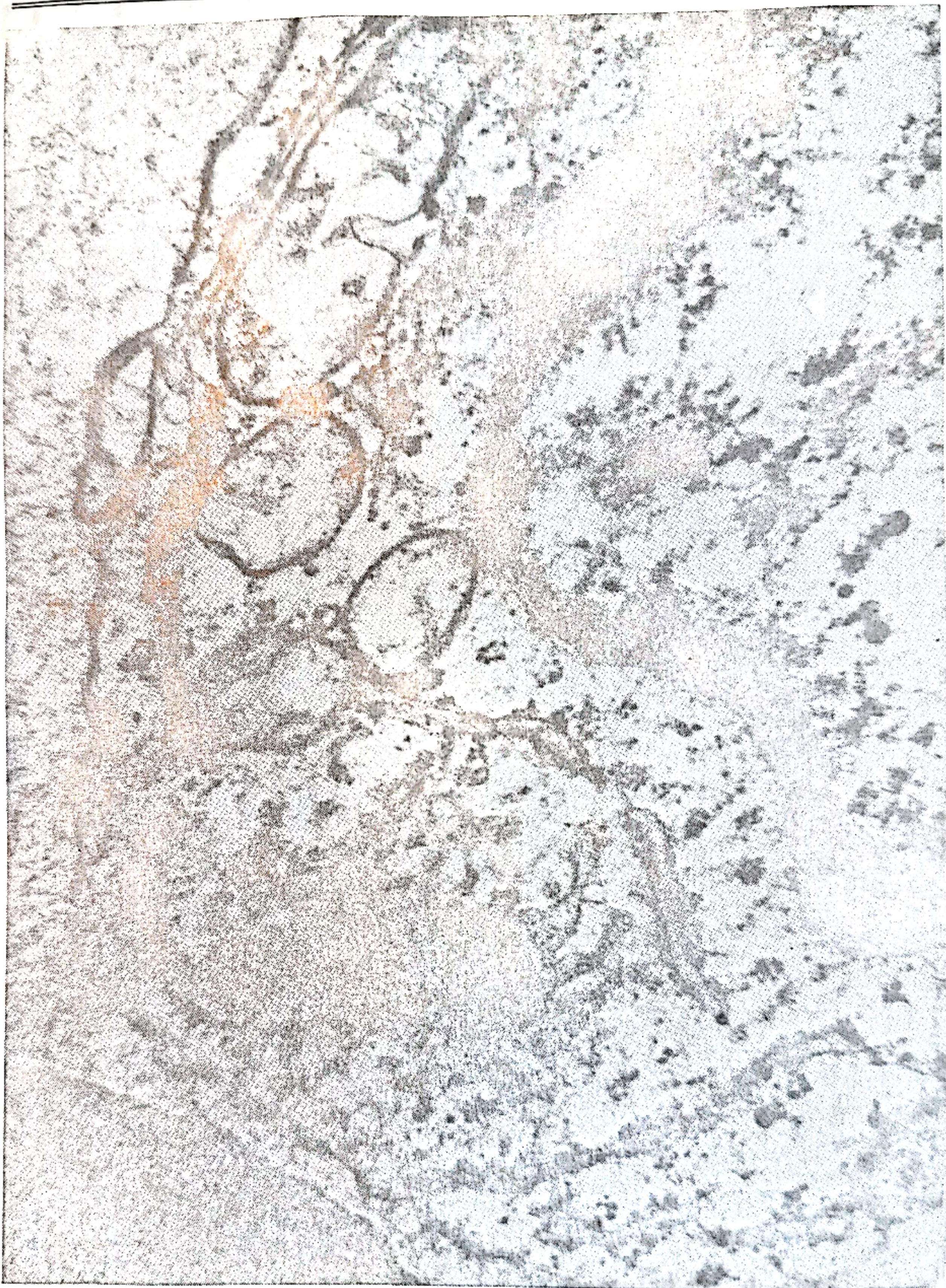


Planşa 8 Cancer colon - Nucleol atipic (ochelar) - 48.000 X
(colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planşa 9 Blastem metanefrogen uman - Nucleu (N), heterocromatina (H), pori nucleari (P), vezicula de endocitoza (Ve) - 16.200 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



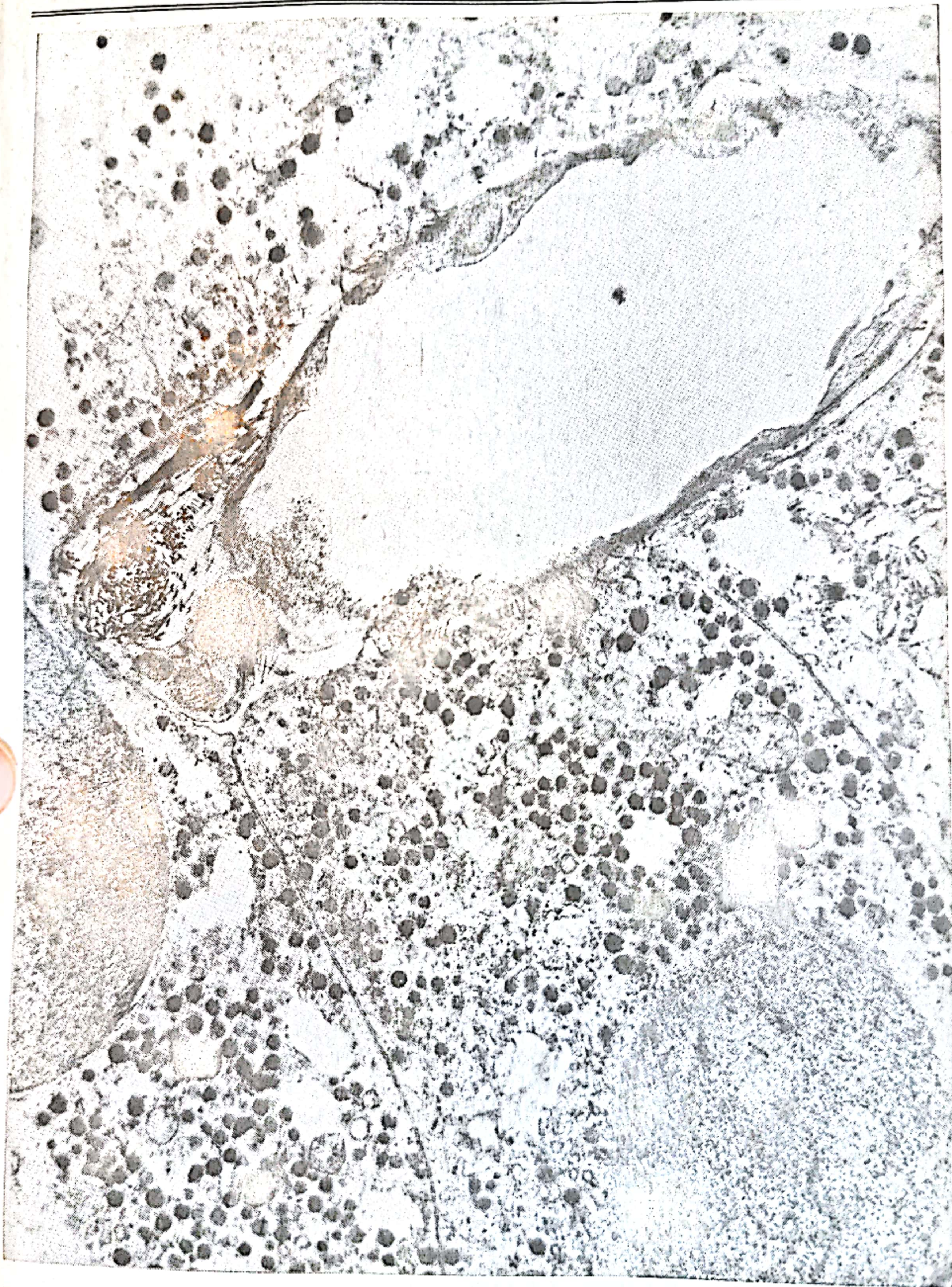
Planşa 10 Celula endotelială capilar corpuscul renal fetus uman - Reticul endoplasmatic granular (REG), ribosomi (R), mitocondrii (M), lumen capilar (Lc), hematie (H) - 45.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



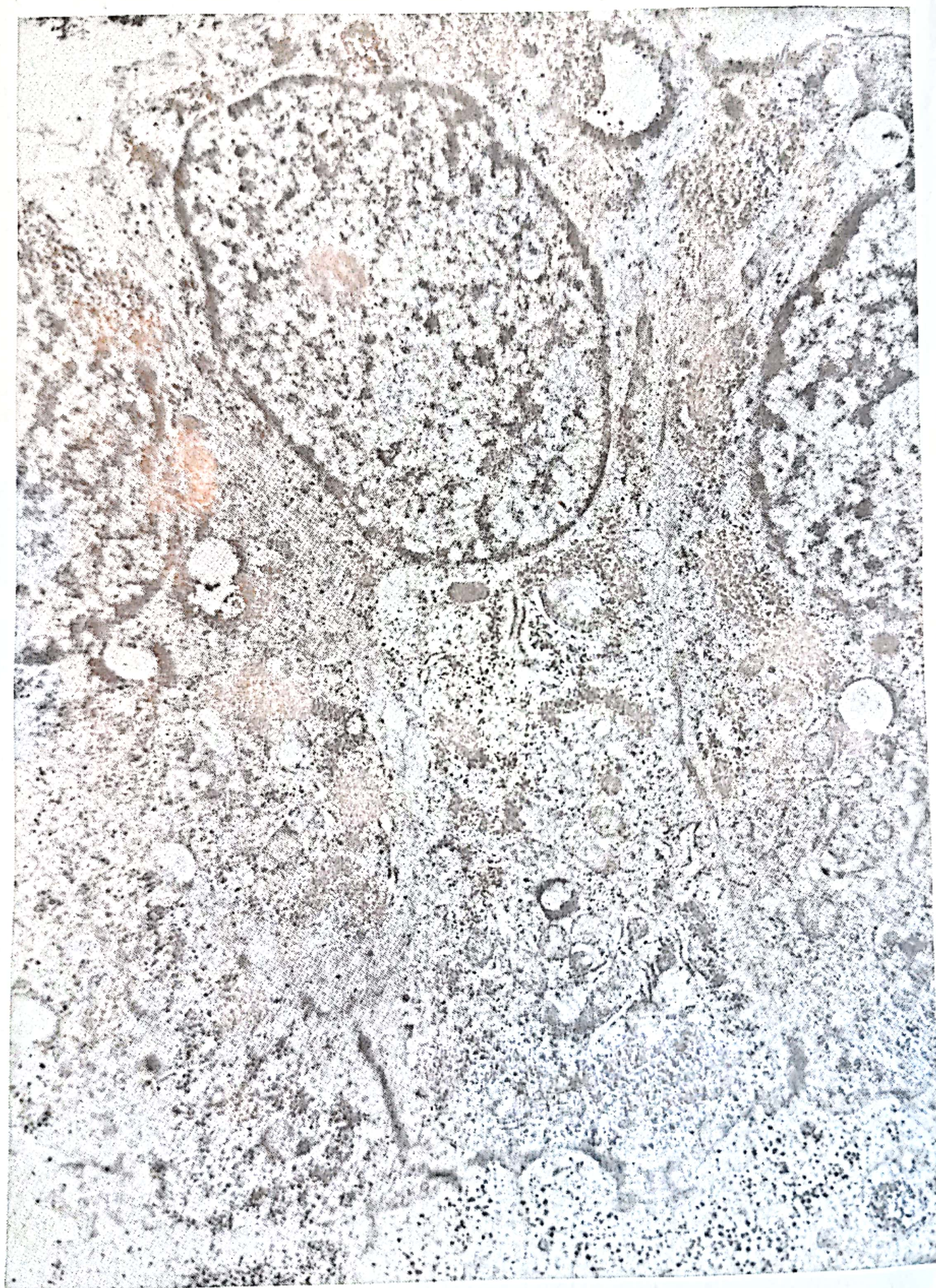
Planşa 11 Entrocit fetal uman - Complex Golgi (CG), faţa de formare (CIS), faţa de maturare (TRANS), nucleu (N), învelişul nuclear (IN), nucleonul (Nu), mitocondrie (M), lizosomi (L) - 41.300 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



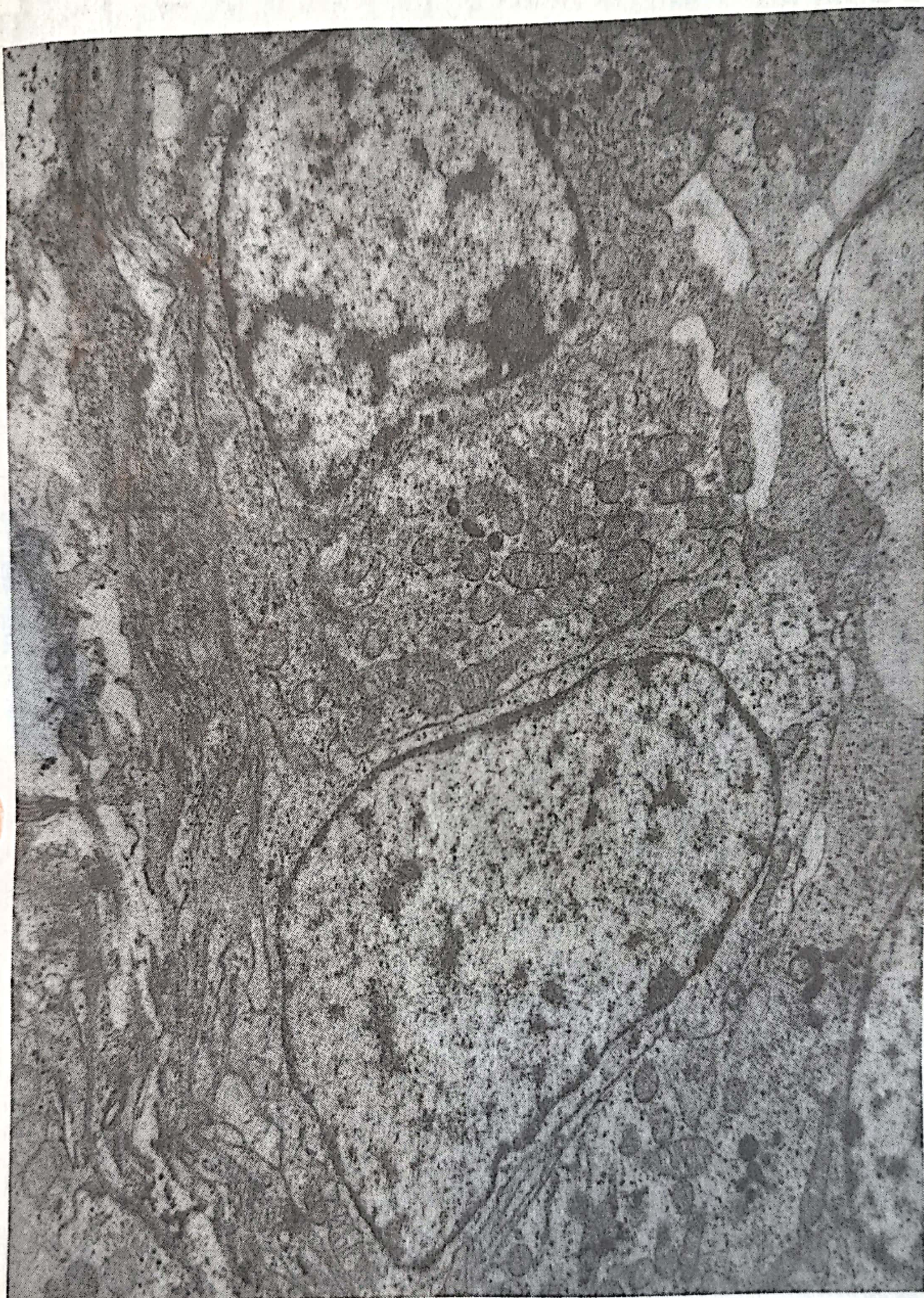
Planşa 12 Celula endocrină pancreas şobolan - Granule de secreţie în diferite faze de maturare (G), capilar (C) - 16.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



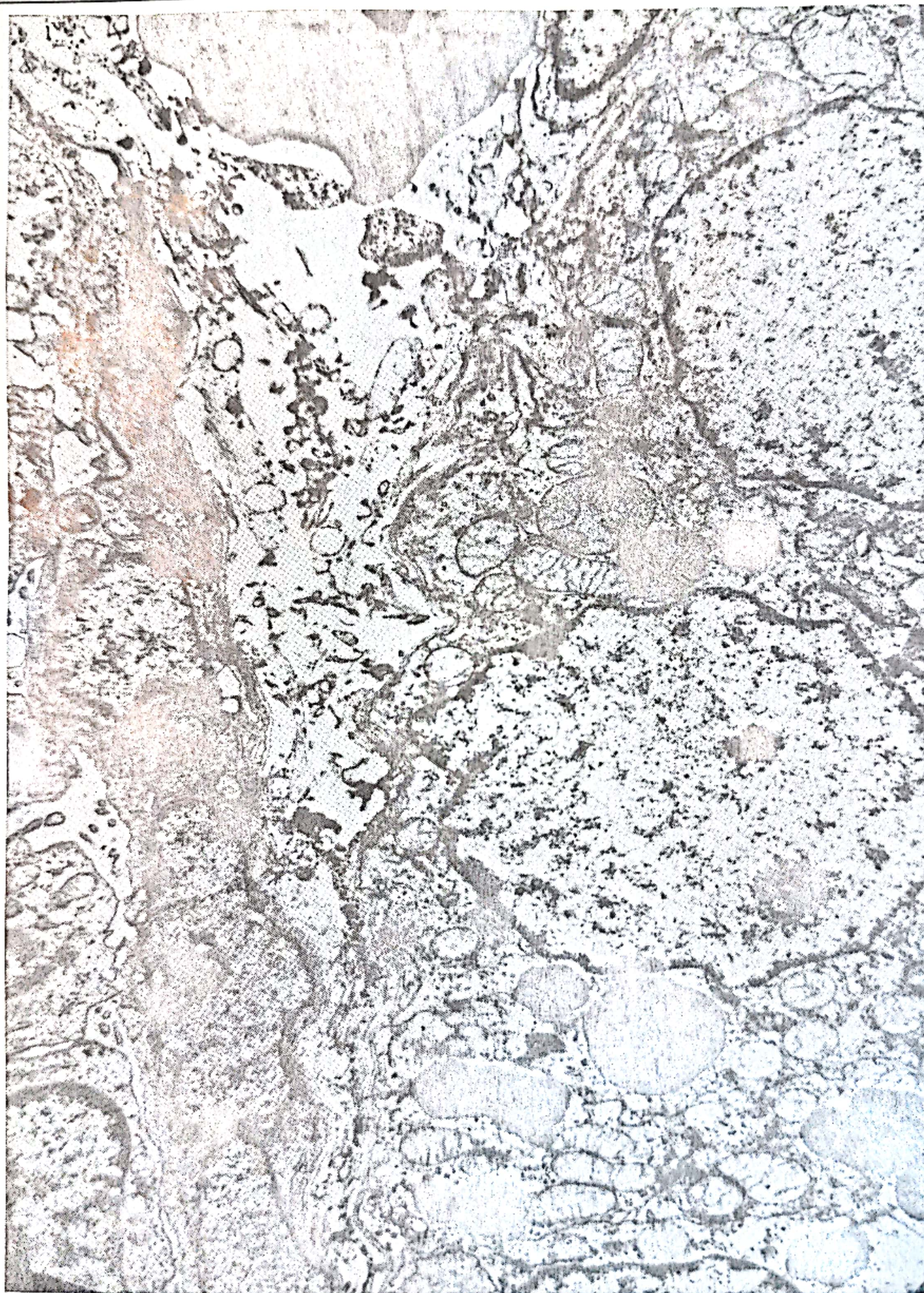
Planşa 13 Epiteliu mucoasa gastrică embrion uman - Granule de glicogen (Gl) 6700 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



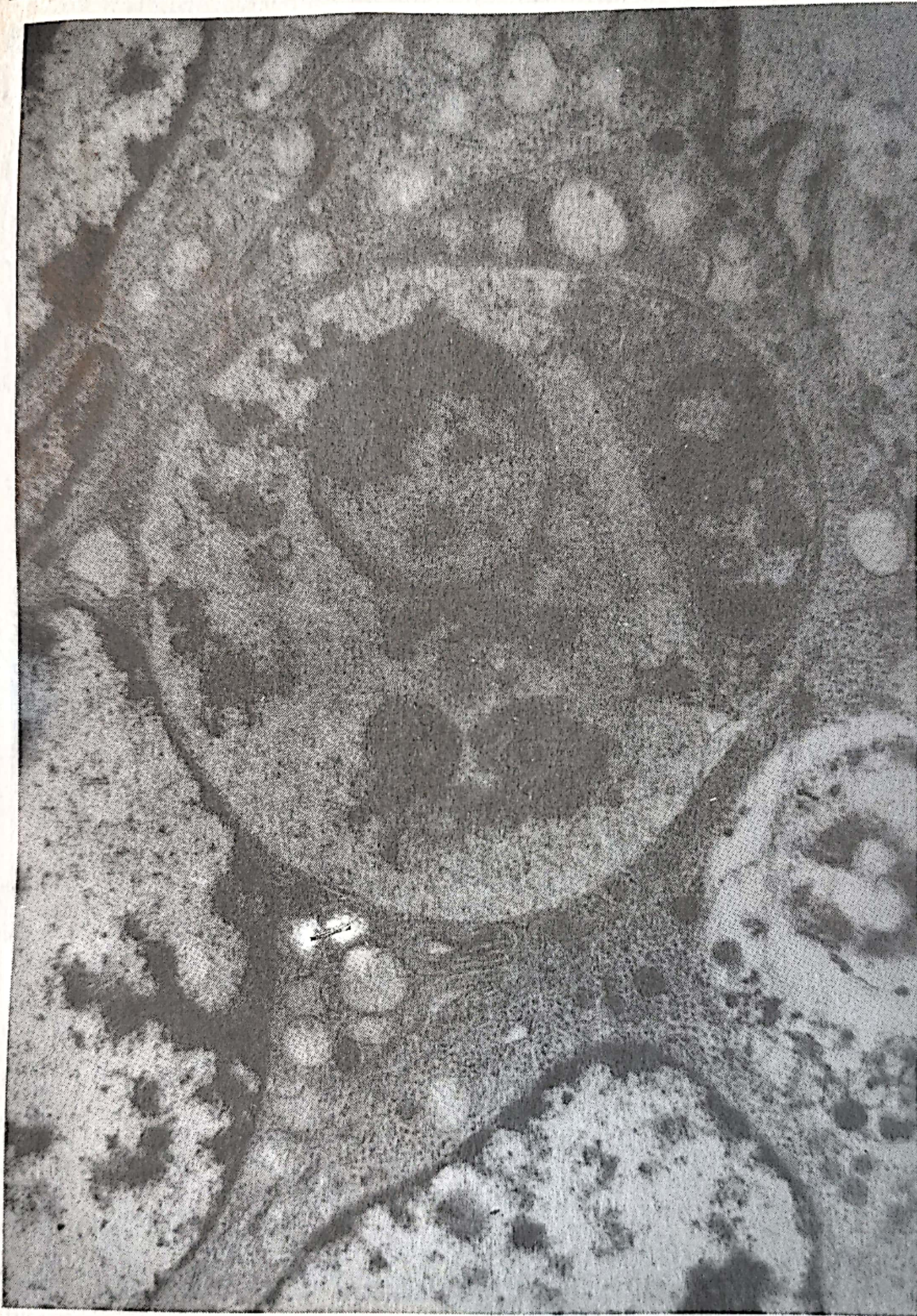
Planşa 14 Nefrocite embrion uman - Nucleu (N), mitocondrii (M), lizosomi secundari (Ls) - 4.400 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



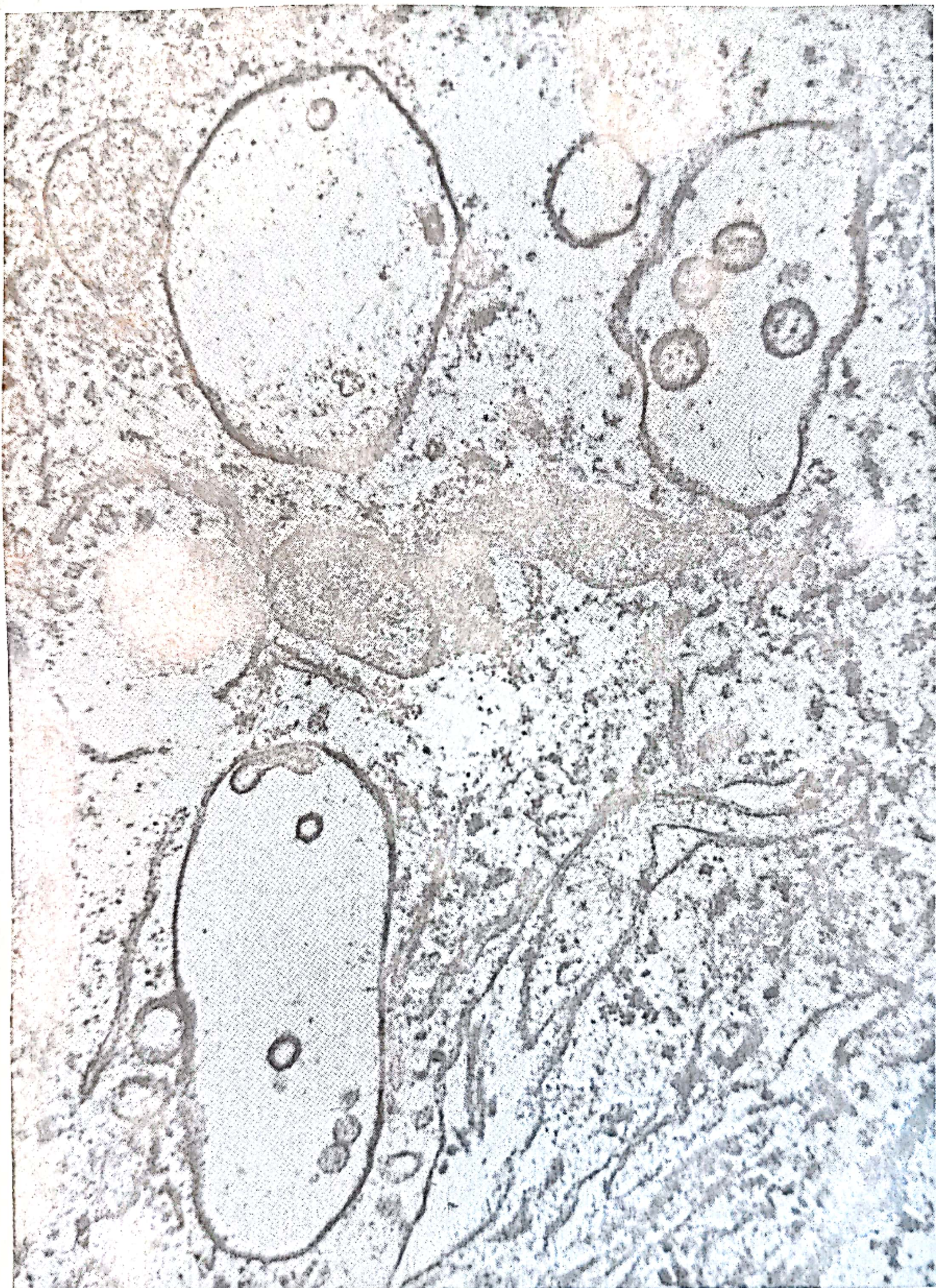
Planşa 15 Nefrocite embrion uman - Nucleu (N), nucleol (Nu), lizosom primar (Lz), lizosomi secundari (Ls), mitocondrii (M) - 17.600 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



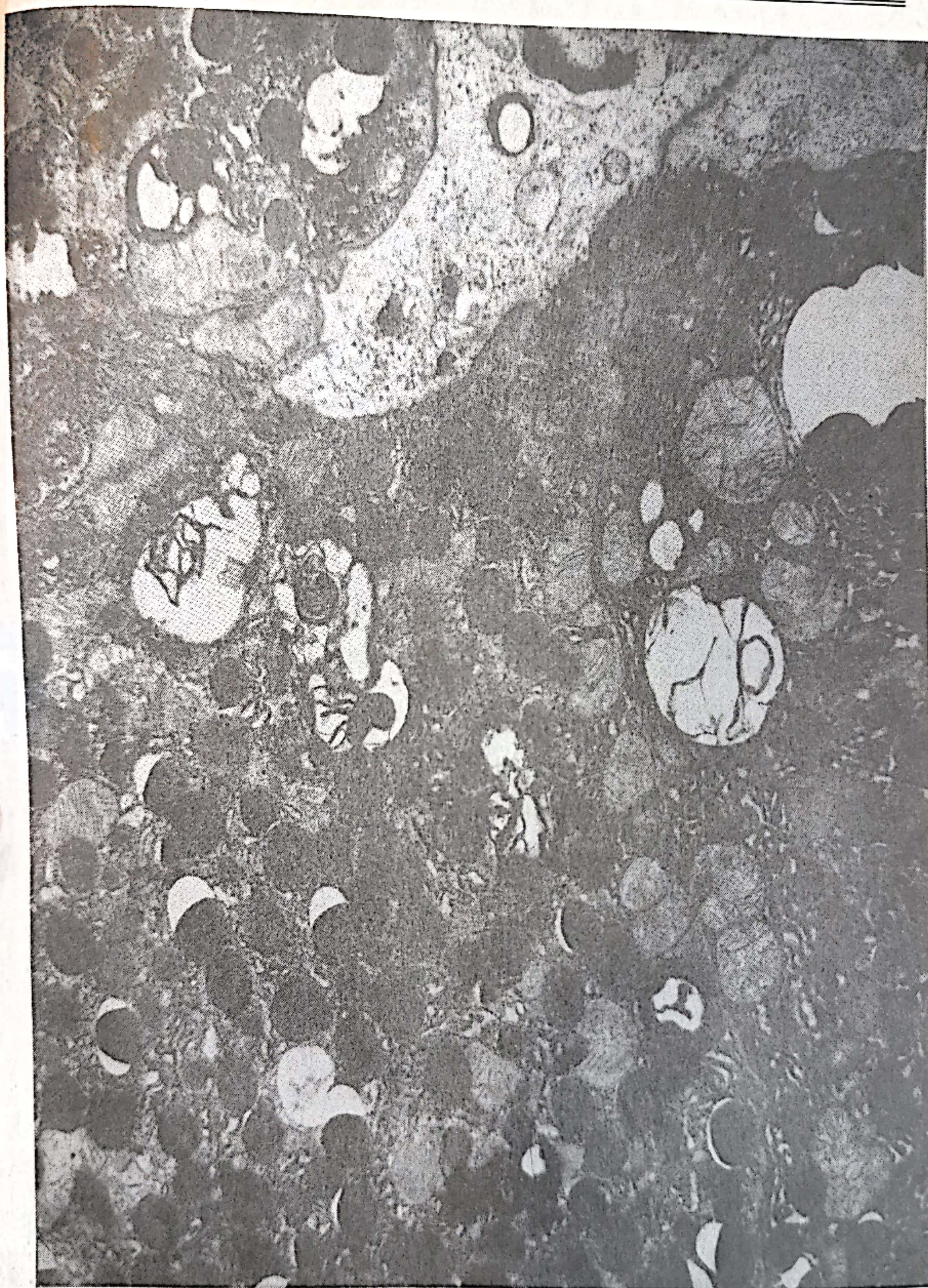
Planşa 16 Cancer colon - Lizosom secundar atipic (Ls), nucleu (N) - 17.600 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



Planşa 17 Nefrocit embrionar uman - Corpi multiveziculari (Cmv), mitocondrie (M), reticul endoplasmatic granular (REG) - 59.600 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



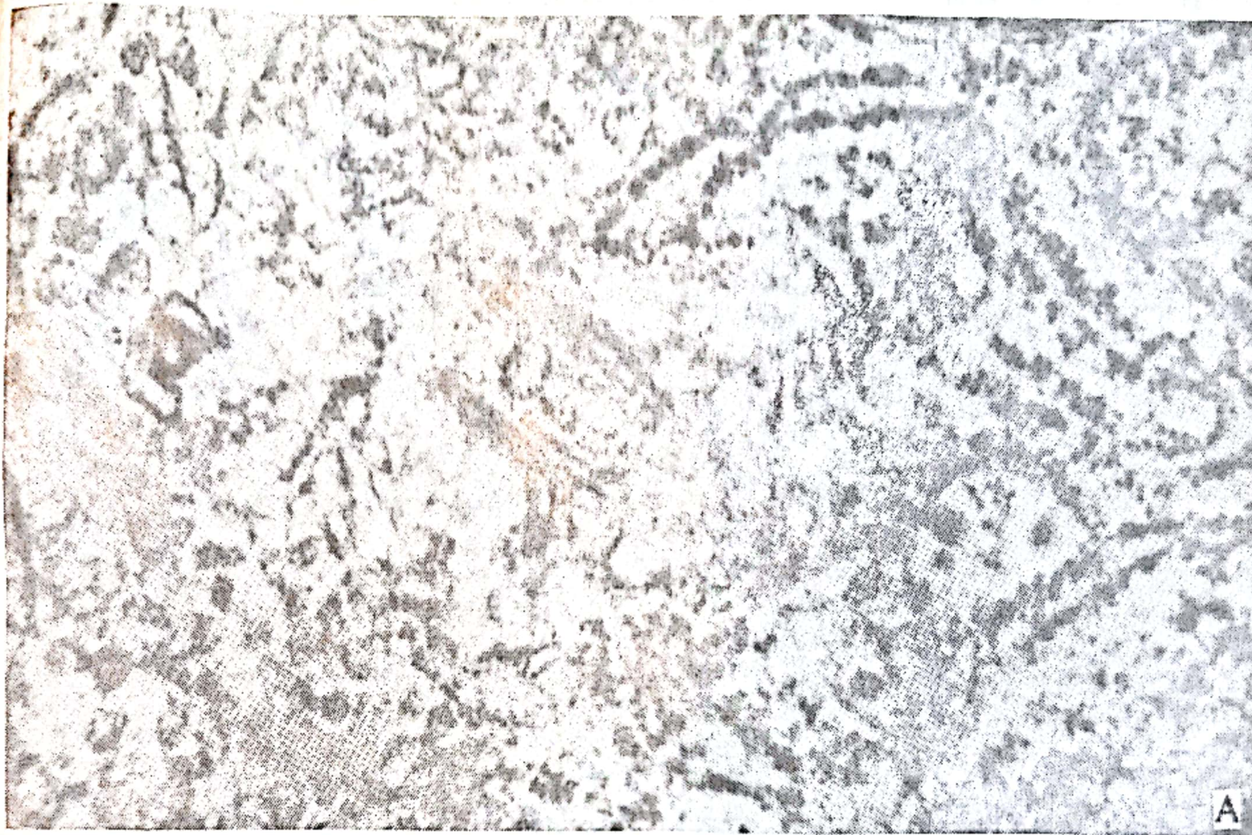
Planşa 18 Hepatocit şobolan - Figuri mielinice (Fm), mitocondrie (M), granule lipidice (Gl) - 17.600 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

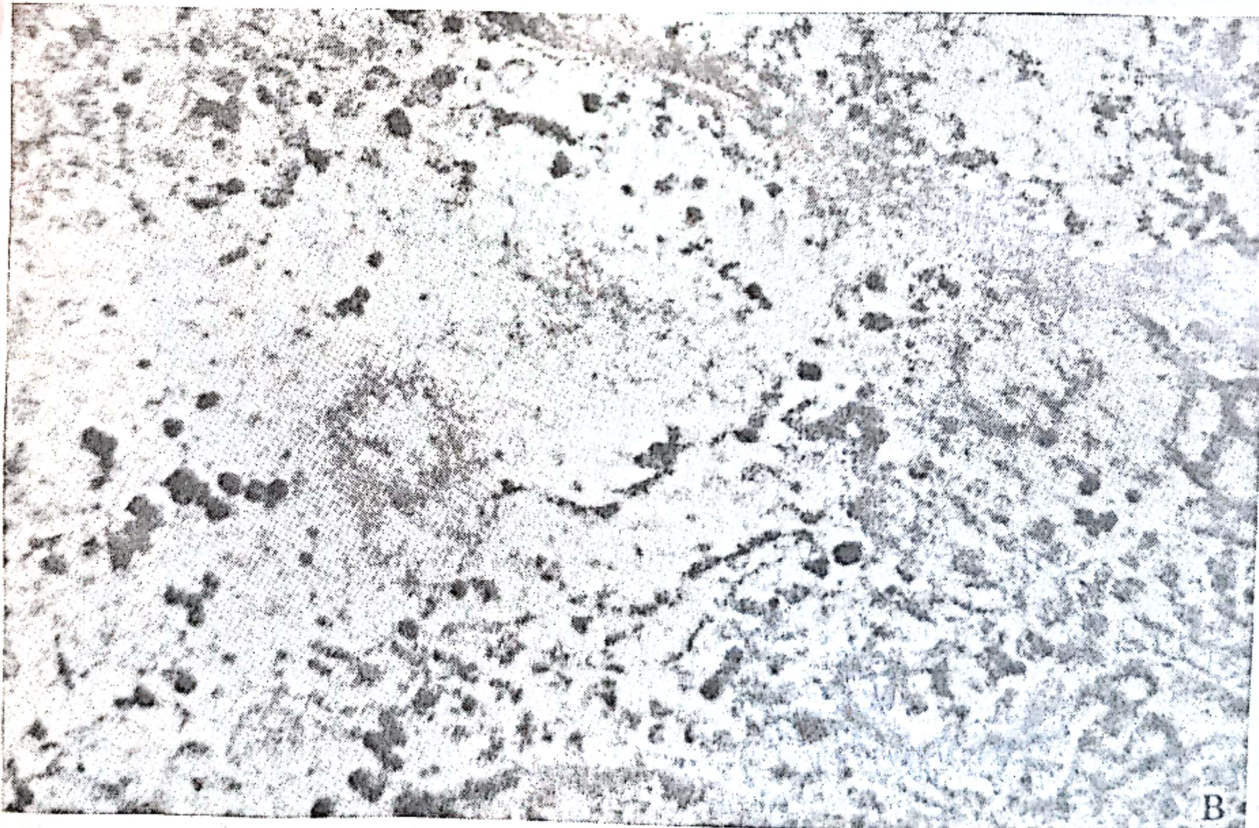
Scanned with OKEN Scanner



Planşa 19 Muşchi striat şobolan - Miofilamente (Mf) - 17.600 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner

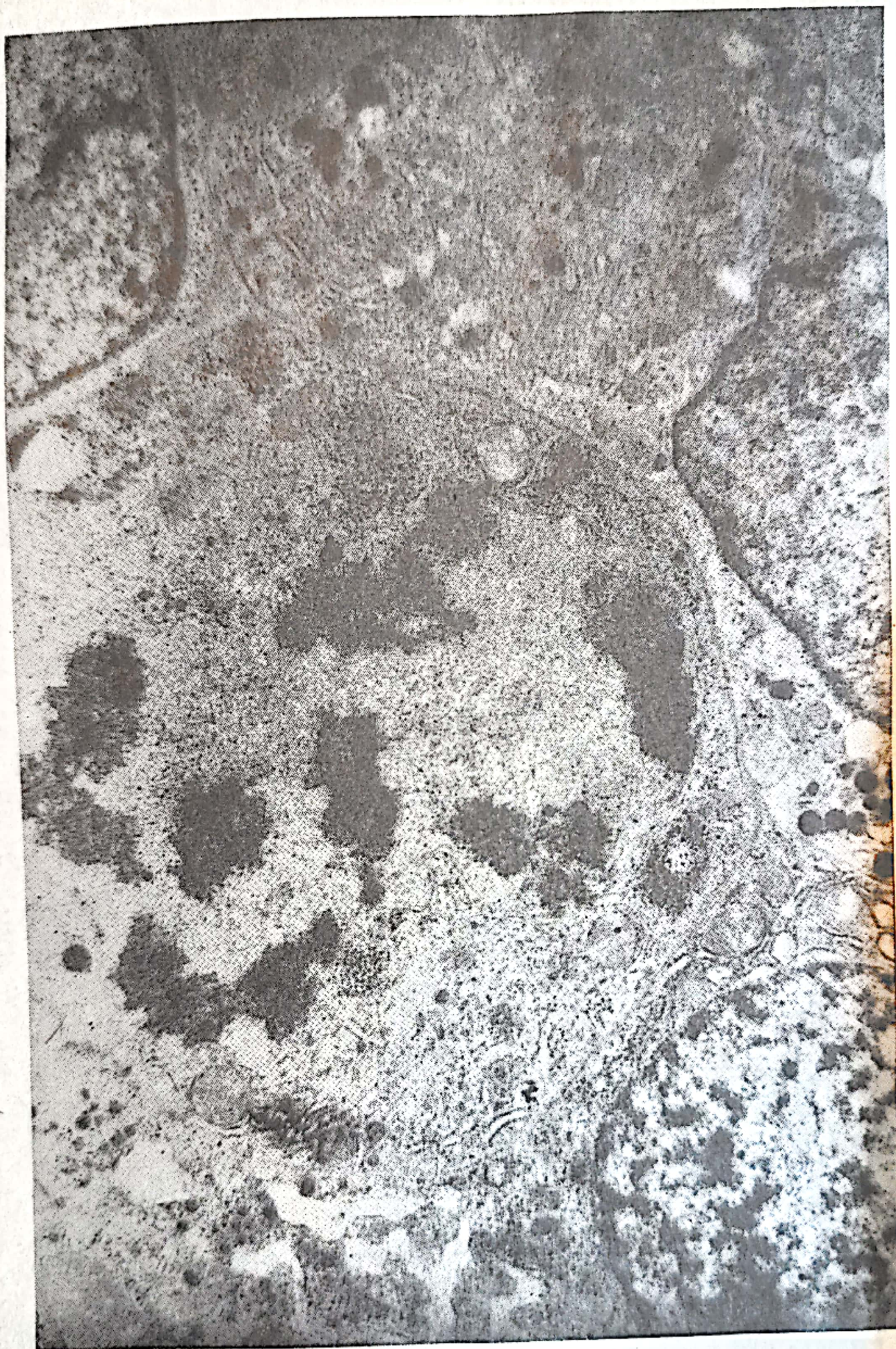




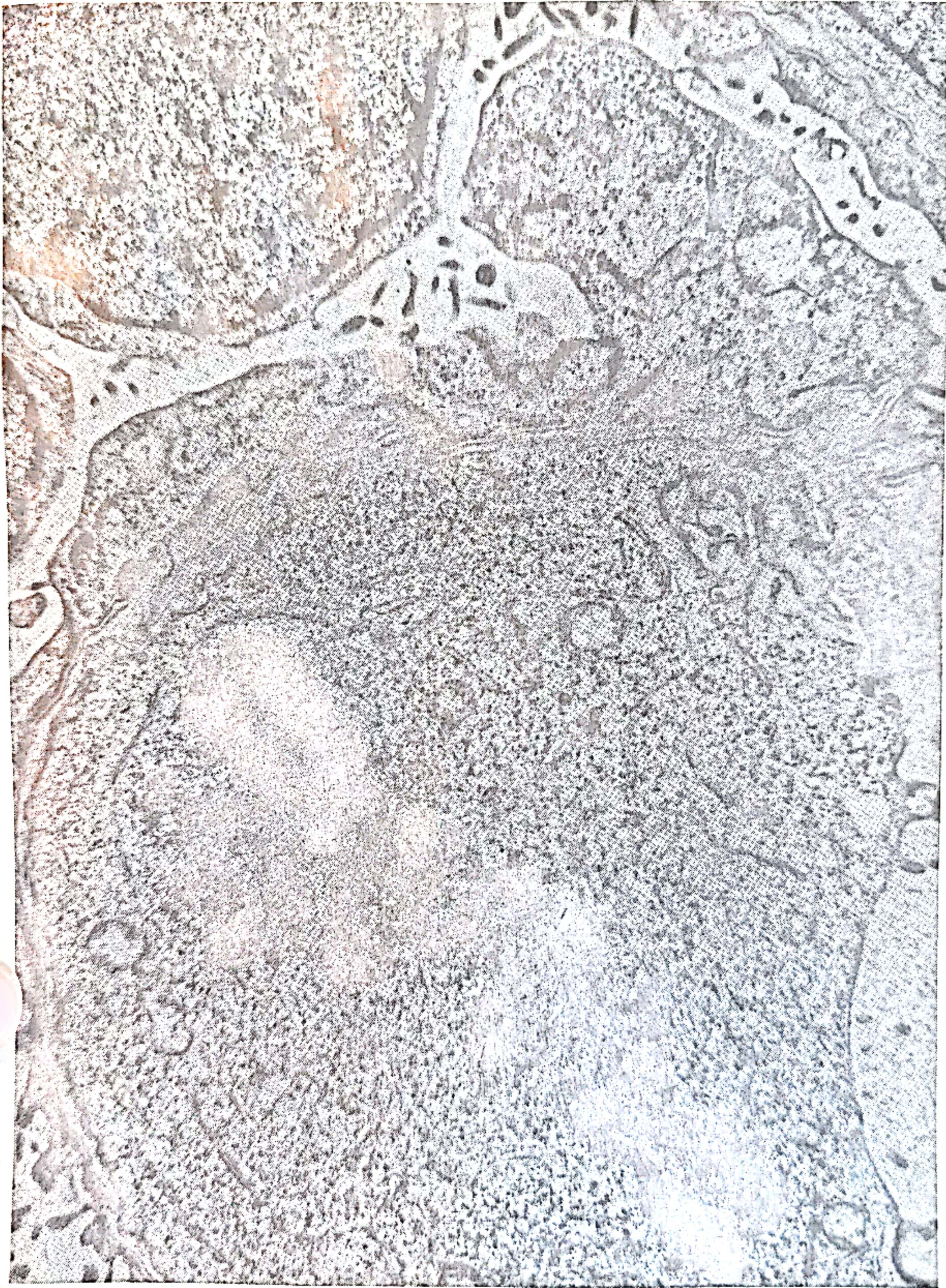
Planşa 20 Nefrocit embrionar uman - Centriol (C) - A.secţiune longitudinală; B. secţiune transversală - 84.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

16

Scanned with OKEN Scanner

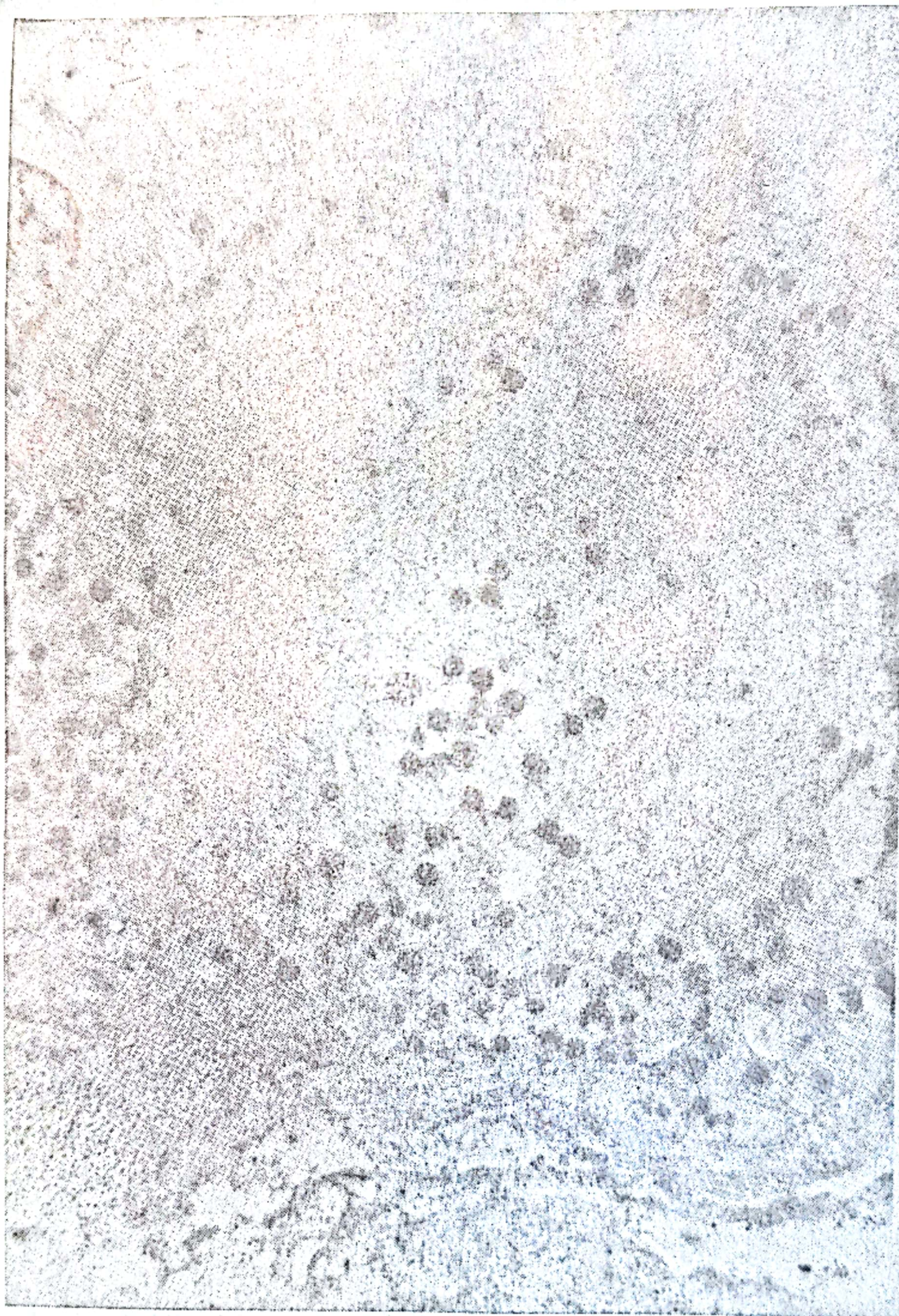


Planşa 21 Entrocite fetus uman - Mitoza somatică - profaza, cromosom (Cr) - 20.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



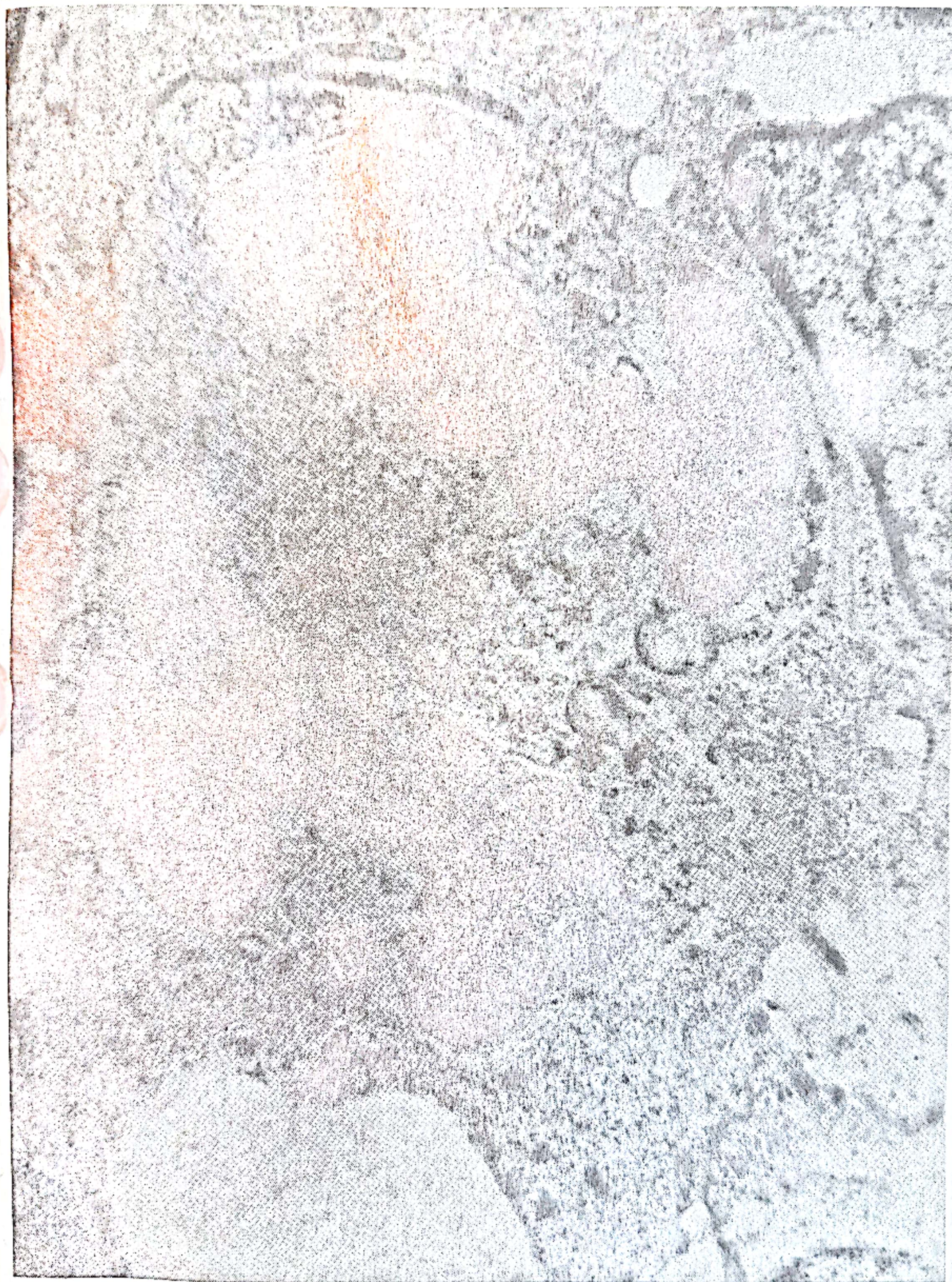
Planşa 22 Endoteliu capilar metanefros uman - Mitoza somatică - metafaza -placa ecuatorială (Pe) - 26.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



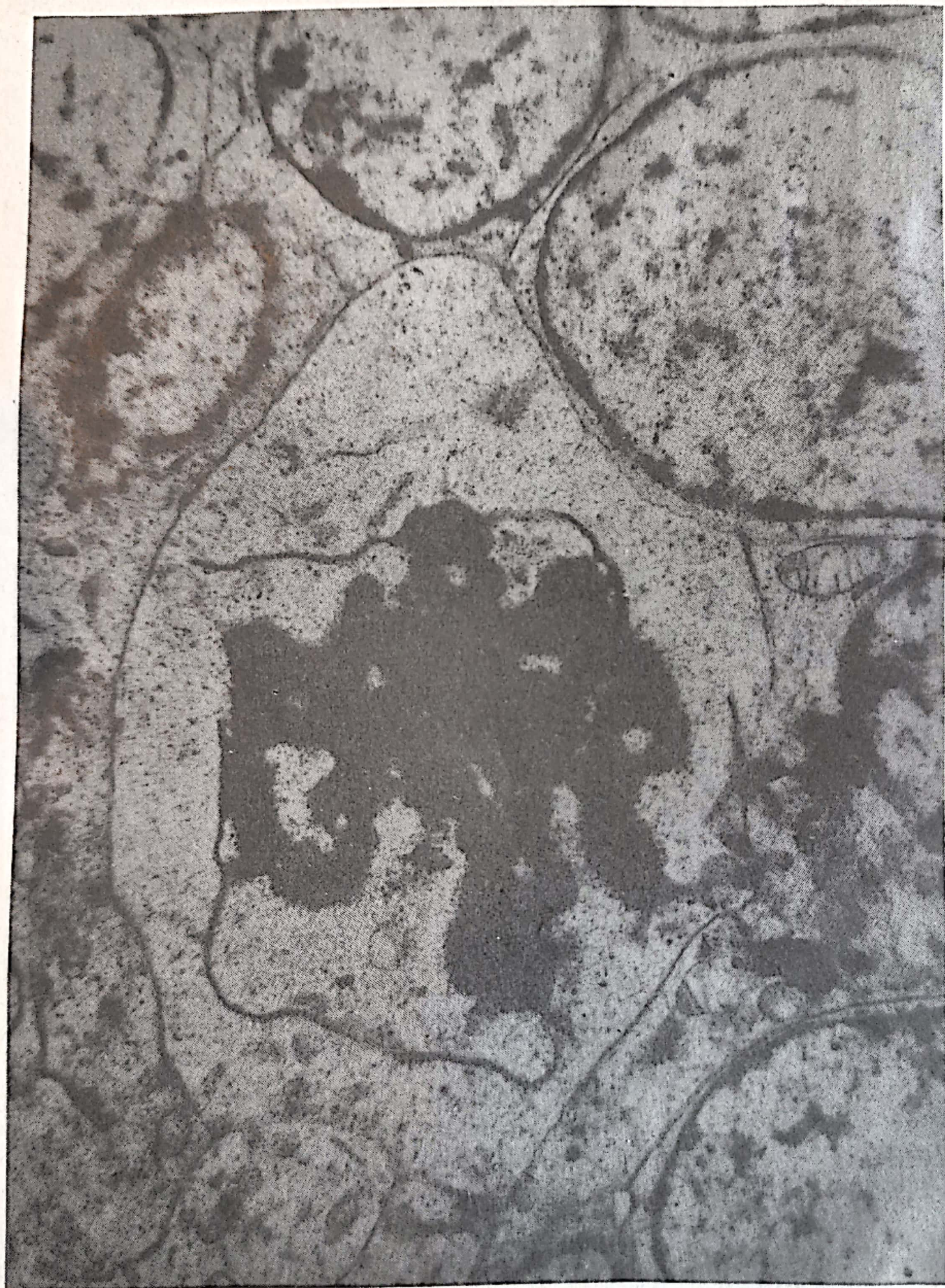
Planşa 23 Celula SED din mucoasa gastrică embrion uman - Mitoza somatică - anafaza, cromosom (Cr) - 16.500 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



Planşa 24 Blastem metanefrogen uman - Mitoza somatică - telofaza - 18.700 X
(colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner



Planşa 25 Blastem metanefrogen uman - Mitoza somatică - telofaza, formarea învelişului nuclear (In) - 6.600 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

Scanned with OKEN Scanner

XVII. *BIBLIOGRAFIE*

1. **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.** - *Molecular Biology of the cell, Garland Publishing, Inc. (N.Y.), 1990.*
2. **Andreicut Silvia, Becus M., Lokotis M., Avrigeanu V.** - *Biologie celulară, Îndrumător de lucrări practice şi demonstraţii, Litografia I.M.F. Tg. Mureş, 1985.*
3. **Andrews A.T.** - *Electrophoresis, Oxford University Press (NY), 1981*
4. **Berkaloff A., Bourguet J., Favard P., Lacroix J.C.** - *Biologie et Physiologie Cellulaires, Vol.I, Herman, 1981.*
5. **Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemlli U.K.** - *Peptide mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecylsulfate and Analysis by gel Electrophoresis, J. Biol. Chem, 52, 1102-1106, 1977.*
6. **Colowick S.P., Kaplin N.O.** - *Methods in Enzymology, Academic Press (NY), 1982.*
7. **Cooper T.G.** - *The Tools of Biochemistry, Niley (NY), 1977.*
8. **Cotaescu I.** - *Sângele normal şi periferic, Editura Facla, Timişoara, 1973.*
9. **Cotrutz C.** - *Biologie celulară, Îndrumător de lucrări practice, Litografia I.M.F. Iaşi, 1989.*
10. **Darnell J., Lodish H., Baltimore D.** - *Molecular Cell Biology, Scientific American Book (NY), 1990*
11. **De Duve C.** - *Exploring Cell with a Centrifuge, Science, 189, 433-435, 1975.*
12. **De Duve C., Beaufay H.** - *A Short History of Tissue Function, J.Cell. Biol., 91, 293-299, 1981.*
13. **Defelipe J., Fairen A.** - *Simple and reliable Method for Correlative Light and Electron Microscopic Studies, J.Histochem.Cytochem, 41,769-772, 1993.*
14. **DeRobertis E.D.P., DeRobertis E.M.F.** - *Cell and Molecular Biology, Saunders College, Philadelphia, 1980.*
15. **Diculescu I., Onicescu Doina, Popescu L.M., Bostinaru P.A.** - *Biologie Celulară, Ghid pentru lucrări practice şi demonstraţii, Litografia I.M.F., Bucureşti, 1980.*
16. **Gabe M.** - *Tehniques Histologiques, Masson et Cie., Paris, 1968.*
17. **Ganter P., Jolles G.** - *Histochimie Normalé et Patologique, Vol.I, II, Gauthier-Villars, 1970.*

18. *Griffin A.M., Griffin H.C.* - *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, 1993.
19. *Harold D.E., Walz W.* - *Basis Techniques for cell Culturing*, The Humana Press Inc., 1992.
20. *Kaplan J.C., Delpech M.* - *Biologie Moléculaire et medicine*, Flammarion, Paris, 1990.
21. *Kim F., Low N.* - *A Gas Chromatograph Detector System for High-Confidence Identification*, International Lab., 24, 17-20, 1994.
22. *Mayer F.* - *Moderne Elektronmikroskopie auf Zellulärem und Makromolekularem Niveau*, Naturwissenschaften, 74, 423-430, 1987.
23. *Murray A.B., Schulze H., Blauw E.* - *In Situ Embedding of Cell Monolayers Cultured on Plastic Surfaces for Electron Microscopy*, Biotech. Histocem., 34, 269-272, 1991.
24. *Pawley J.B.* - *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Publ. Corp., 1990.
25. *Ploaie P.G., Petre Z.* - *Introducere în microscopia electronică*, Editura Academiei, Bucureşti, 1979.
26. *Robb I.A., Carpenter B.F.* - *Rapid Ultrasonic Bath Processing for Electron Microscopy*, Ultrastruct. Pathol., 15, 83-86, 1991.
27. *Shaw P.J., Rawlins D.J.* - *Three - Dimensional Fluorescente Microscopy*, Prog. Biophys. Molec. Viol., 56, 187-213, 1991.
28. *Stelzer E.H.K.* - *Confocal Fluorescente Microscopy in Cytology*, Noninvasive Techniques in Cell Biology, Wiley-Liss, Inc., 1990.
29. * * * *Centrifugation Techniques II-IV*, Opti Prep., Nicomed Pharma, Oslo, Norway, 1993.

TABLA DE MATERII

Scanned with OKEN Scanner

II. MIJLOACE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA FOTONICĂ

III. COLORAREA ŞI COLORANŢII ÎN BIOLOGIA CELULARĂ

IV. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Scanned with OKEN Scanner

VII. STUDIUL GENERAL AL CELULEI ŞI AL ÎNVELIŞULUI CELULAR

VIII. STUDIUL NUCLEULUI ÎN INTERFAZĂ

Scanned with OKEN Scanner

IX. ORGANITELE SINTEZEI ŞI SECREŢIEI CELULARE

X. ORGANITE GENERATOARE DE ENERGIE. MITOCONDRIILE

XI. ORGANITELE DIGESTIEI CELULARE

Scanned with OKEN Scanner

XII. ORGANITELE MOBILITĂŢII CELULARE

XIII. DIVIZIUNEA CELULARĂ

Scanned with OKEN Scanner

XIV. DIFERENŢIEREA CELULARĂ

XV. TEHNICI SPECIALE UTILIZATE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ŞI MOLECULARĂ

Scanned with OKEN Scanner

ERATA

pag. 7 - rând 9,11,14	- bilogice	biologice
" 10 - " 25	- tapla	talpa
" 13 - " 8	- bilogice	biologice
" 15 - " 28,29	- fluoresecta	fluorescenta
" 16 - " 18	- imunofluoresecta	imunofluorescenta
" 35 - " 17,23	- bipsie	biopsie
13,19,20	- bilogic	biologic
" 36 - " 1	- bilogice	biologice
4	- oxitice	ascitice
" 37 - " 36	- bilogic	biologic
" 41 - " 25	- ovalalbuminei	ovalbuminei
" 45 - " 32	- mercuriana	mercurica
" 46 - " 4,9,13	- biocromat	bicromat
" 48 - " 13	- diaxonul	dioxanul
" 49 - " 16	- Leuckhard	Leuckardt
" 50 - " 19	- prafina	parafina
" 54 - " 2	- poi	apoi
32	- salacilat	salicilat
" 57 - " 4	- anhidra	anhidrida
" 59 - " 18	- succindehidrogeneza	succindehidrogenaza
" 66 - " 18	- celulata	celulara
21	- hemoglobulina	hemoglobina
" 68 - " 35	- trombosteina	trombostenina
" 70 - " 22	- promilocit	promielocit
" 71 - " 6	- Grüvald	Grünwald
" 74 - " 13	- descumarea	descuamarea
" 79 - " 11	- hematoxina	hematoxilina
" 85 - " 20,21	- este implicat	sunt implicați
" " 32	- fericiaura	fericianura
" 94 - " 26	- supfetelor	suprafețelor
" 99 - "Fig.24	- vial	final
"100 - " 12	- metilanadica	metilnadica
"132 - " 22	- misculare	musculare
"134 - " 22	- membrabei	membranei
"136 - " 17,21,25	- glioalixul	glicocalixul
"150 - " 10	- arasat	atașat
"155 - " 5	- trilamentate	trilamelate
"158 - " 10	- hepatocitate	hepatocite
"165 - " 5	- tripantite	tripartite
"170 - " 30	- dendridice	dendritice

Scanned with OKEN Scanner